MiSeqDx™ 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Katalognummer DX-102-1004: 2 Läufe, bis zu 96 Proben pro Kit

Katalognummer DX-102-1003: 20 Läufe, bis zu 960 Proben pro Kit

Verwendungszweck

Der Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose ist ein qualitatives *In-vitro*-Diagnostiksystem, das zum gleichzeitigen Erkennen von 139 klinisch relevanten CF-verursachenden Mutationen und Varianten des *CFTR*-Gens in genomischer, aus menschlichen peripheren Blutproben isolierter DNA verwendet wird. Zu den Varianten gehören diejenigen, die 2004 vom American College of Medical Genetics (ACMG)[1] und 2011 vom American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)[2] empfohlen wurden. Der Test wurde für das Träger-Screening bei Erwachsenen im gebärfähigen Alter, als Zweitdiagnose bei Neugeborenen und Kindern und als ein erster Test für die Diagnose bei Personen mit Verdacht auf zystische Fibrose entwickelt. Die Ergebnisse dieses Tests sollten von einem zertifizierten klinischen Molekulargenetiker oder einem gleichwertig qualifizierten Kollegen interpretiert werden und in Verbindung mit anderen verfügbaren Labor- und klinischen Informationen verwendet werden.

Dieser Test ist nicht für Tests im Bereich des Neugeborenen-Screenings, der pränatalen Diagnostik und der Präimplantation sowie für unabhängige Diagnosezwecke indiziert.

Der Test muss auf dem IlluminaMiSeqDx-Gerät durchgeführt werden.

Zusammenfassung und Erläuterung des Assay

Klinische Beschreibung

Die Mukoviszidose (oder zystische Fibrose, ZF) ist eine der häufigsten genetischen Erkrankungen der westlichen Welt und die am häufigsten auftretende lebensbedrohliche autosomal-rezessive Erkrankung in der nicht hispanischen weißen Bevölkerung[3-7]. ZF wirkt sich auf die Viskosität der Schleimsekrete aus und befällt die Epithelien der Atemwege, die Bauchspeicheldrüse, den Darm, das hepatobiliäre System, den männlichen Genitaltrakt und die Schweißdrüsen, was zu einer komplexen Multiorgan-/Multisystemerkrankung führt[4-6], wobei die Lunge das primäre Organ bezüglich Morbidität und Mortalität ist[8]. In vielen Fällen sind eine Mangelernährung oder Verdauungsstörungen Vorboten von durch ZF verursachten Lungenerkrankungen. Ein Schwerpunkt der aktuellen interventionellen Anstrengungen liegt daher in der Früherkennung der Erkrankung durch ein Neugeborenen-Screening[7], wodurch die frühzeitige lebenswichtige medizinische Versorung sichergestellt und für Menschen mit dieser Erkrankung das bestmögliche Ergebnis erzielt werden soll[4,7]. Obwohl es bei der Lebenserwartung geschlechtliche Unterschiede gibt – die mittlere Lebenserwartung ist bei Männern höher als bei Frauen – liegt die allgemeine Lebenserwartung in den USA bei 38,3 Jahren[8].

CFTR-Varianten und Inzidenz

Das Gen „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (*CFTR*) wurde 1989 identifiziert. Es befindet sich am langen Arm des Chromosoms 7 und enthält 27 kodierende Exons, verteilt über 230 kb[4]. Eine 6,5-kb-mRNA, die von dem normalen Allel produziert wird, kodiert CFTR, ein 1490-Aminosäure-haltiges Membranprotein, das als regulierter Chlorid-Kanal in den Epithelzellen mehrerer Organe fungiert[3,5]. Derzeit sind über 1.900 Varianten des *CFTR*-Gens beschrieben, wobei die Mehrheit davon Punktmutationen sind[9]. Die häufigste *CFTR*-Variante ist das F508del-Allel[5],

das fast 70 % aller *CFTR*-Varianten ausmacht[3]. Allerdings resultieren die anderen häufig auftretenden *CFTR*-Varianten oft in einem CF-Phänotyp und anderen auf CFTR zurückzuführenden Erkrankungen[3-5].

Die Mukoviszidose hat eine geschätzte Erkrankungshäufigkeit von einer in 2.000 bis 4.000 Lebendgeburten und eine Prävalenz von rund 30.000 Personen in der US-Bevölkerung[4]. Sie tritt in allen ethnischen Gruppierungen mit unterschiedlicher Häufigkeit auf: 1:3.000 bei Weißen, 1:9.200 bei Hispanoamerikanern, 1:10.900 bei amerikanischen Ureinwohnern, 1:15.000 bei Afroamerikanern und 1:31.000 bei der asiatisch-amerikanischen Bevölkerung[4,6]. Aktuelle Schätzwerte der Häufigkeit der Träger der CFTR-Mutation nach Ethnizität in den USA auf Basis einer Kohorte von 364.890 Personen, die zum Trägertest überwiesen wurden und bezüglich Mukoviszidose nicht familiär vorbelastet sind, werden in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1 Allgemeine Trägerhäufigkeit von Mukoviszidose-Mutationen in den verschiedenen ethnischen Gruppen in den USA[10]

Ethnische Gruppe	Beobachtete Trägerhäufigkeit
Afroamerikanisch	1 aus 84
Aschkenasi Jüdisch	1 aus 29
Asiatisch	1 aus 242
Weiß	1 aus 28
Hispanoamerikanisch	1 aus 59
Jüdisch	1 aus 32
Nahöstlich	1 aus 91
Ureinwohner Nordamerikas	1 aus 70
Südasiatisch	1 aus 118
Sonstige ethnische Gruppe	1 aus 111
> 1 ethnische Gruppe	1 aus 34
Teilweise afroamerikanisch	1 aus 56
Teilweise weiß	1 aus 32
Teilweise hispanoamerikanisch	1 aus 51
Keine Angabe	1 aus 37
Alle Personen	1 aus 38

Überblick über das CFTR2-Projekt

Das CFTR2-Projekt ist eine internationale Initiative, die von einem Team aus Forschern und Ärzten geleitet und vom National Institute of Health sowie der U.S. Cystic Fibrosis Foundation gefördert wird.[11,12] CFTR2 soll umfassende und von Experten geprüfte funktionale und klinische Informationen zu *CFTR*-Varianten liefern. In dem Bemühen, alle CF-Varianten mit einer Allelhäufigkeit von mindestens 0,01 % klinisch zu validieren, bündelten 25 CF-Register und -Kliniken weltweit[13] ihre Ressourcen mit dem Ziel, die klinischen Informationen von über 39.000 CF-Patienten mit den nahezu 1.900 CF-Varianten abzugleichen, die im Laufe der Jahre in der CFTR1-Datenbank im Kinderkrankenhaus SickKids Hospital in Toronto aufgezeichnet wurden.[11,13] Klinische Merkmale, z. B. Kochsalzgehalt im Schweiß, Lungenfunktion (prognostizierter FEV 1 %) und Pankreasstatus, wurden zusammen mit den *CFTR*-Genotyp-Informationen analysiert. Der systematische Ansatz der gleichzeitigen Analyse dieser Varianten aus klinischer, funktionaler und genetischer Perspektive heraus ergab 134 eindeutige CF-verursachende Varianten bei 129 eindeutigen genomischen Positionen (da bei fünf Positionen zwei Nukleotidänderungen an derselben Position auftreten), die derzeit in der CFTR2-Datenbank (Stand: August 2013) enthalten sind. Es wird erwartet, dass die Verwendung eines Panels, das alle diese Varianten umfasst, 95,4 % der Allele ausmacht, die zystische Fibrose verursachen, und die Identifikation der gefährdeten Paare durch den Nachweis beider Allele auf ca. 91 % erhöht, im Vergleich zu 72 % mit dem vom ACMG empfohlenen Panel mit 23 Varianten.

CFTR-Varianten im Panel

Die vom MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose gemeldeten Varianten wurden speziell ausgewählt, da sie den kompletten Satz an klinisch validierten Varianten darstellen, die in der CFTR2-Datenbank der Johns Hopkins University, einem Produkt der CFTR2-Initiative (Clinical and Functional Translation of CFTR), als Auslöser für zystische Fibrose klassifiziert sind.

Der Assay testet auf: 134 CF-verursachende Varianten, eine vom ACMG empfohlene Panel-Variante (R117H, von CFTR2 klassifiziert als eine Mutation von variierender klinischer Konsequenz [MVCC, Mutation of Varying Clinical Consequence]), eine bedingt gemeldete modifizierende Variante (PolyTG/PolyT) und drei bedingt gemeldete gutartige Varianten (I506V, I507V, F508C)[14], was zusammen 139 gemeldete Varianten ergibt.

Die 134 CF-verursachenden Varianten entsprechen 129 CF-verursachenden Varianten in der CFTR2-Datenbank. Die CFTR2-Datenbank enthält fünf CF-verursachende Varianten, bei denen dieselbe Proteingehaltänderung aus zwei unterschiedlichen Nukleotidänderungen heraus entstehen kann [z. B. S466X(C>A) und S466X(C>G)]. Diese fünf Varianten sind gemäß dem Aminosäuren-Codon in der CFTR2-Datenbank (z. B. S466X) aufgeführt, während der Assay jede einzelne Variante meldet [z. B. S466X(C>A) und S466X(C>G)]. Die vom MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose gemeldeten 139 Varianten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose – Zusammenfassung der Varianten
[Aufgelistet in der Reihenfolge der genomischen Koordinaten; **Fett**=ACMG-23; *Kursiv*=Bedingt gemeldet]

M1V	T338I	Q552X	3121-1G>A
CFTR dele2,3	1154insTC	**R553X**	3272-26A>G
Q39X	S341P	A559T	L1065P
E60X	R347H	**R560T**	R1066C
P67L	**R347P**	R560K	R1066H
R75X	R352Q	1811+1.6kb A>G	L1077P
G85E	1213delT	1812-1 G>A	W1089X
394delTT	1248+1G>A	E585X	Y1092X(C>A)
405+1 G>A	1259insA	**1898+1G>A**	Y1092X(C>G)
406-1G>A	W401X(c.1202G>A)	1898+3A>G	M1101K
E92X	W401X(c.1203G>A)	2143delT	E1104X
E92K	1341+1G>A	R709X	R1158X
Q98X	*PolyTG/PolyT*	K710X	**R1162X**
457TAT>G	1461ins4	2183delAA>G	**3659delC**
D110H	**A455E**	2184insA	S1196X
R117C	1525-1G>A	**2184delA**	W1204X (c.3611G>A)
R117H	S466X(C>A)	2307insA	W1204X (c.3612G>A)
Y122X	S466X(C>G)	L732X	3791delC
574delA	L467P	2347delG	**3849+10kbC>T**
621+1G>T	1548delG†	R764X	G1244E
663delT	S489X	2585delT	3876delA
G178R	S492F	E822X	S1251N
711+1G>T	Q493X	2622+1G>A	3905insT
711+3A>G	**I507del**	E831X	**W1282X**
711+5 G>A	**F508del**	W846X	4005+1G>A
712-1 G>T	1677delTA	R851X	**N1303K**
H199Y	V520F	2711delT	4016insT
P205S	Q525X†	**2789+5G>A**	Q1313X
L206W	1717-8G>A	Q890X	4209TGTT>AA
Q220X	**1717-1G>A**	L927P	CFTRdele22,23
852del22	**G542X**	S945L	4382delA

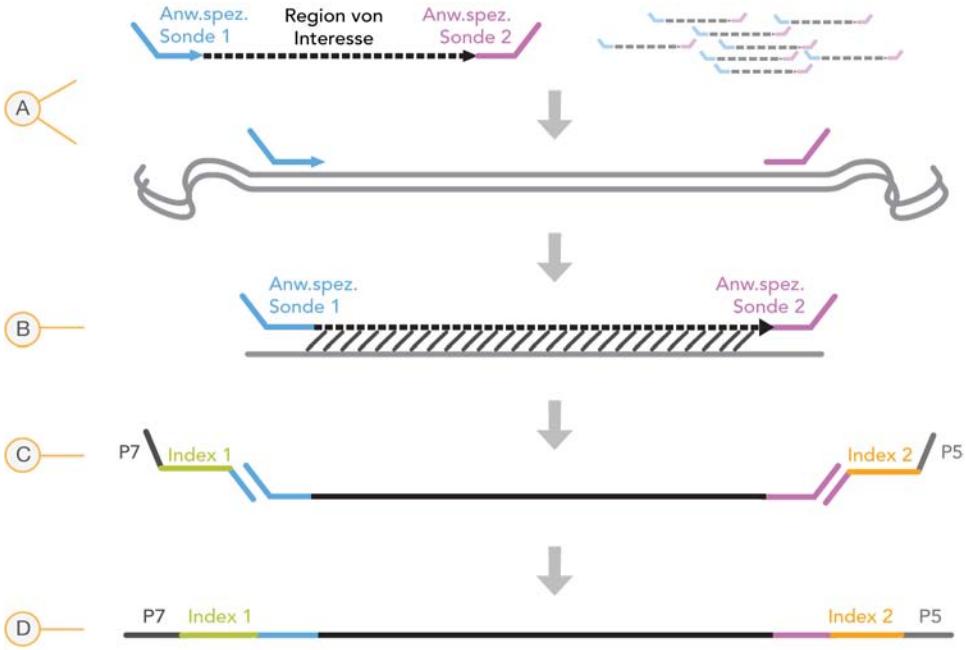
1078delT	S549R(c.1645A>C)	3007delG	*I506V*
G330X	S549R(c.1647T>G)	G970R	*I507V*
R334W	S549N	3120G>A	*F508C*
I336K	**G551D**	**3120+1G>A**	

† In der CFTR2-Datenbank[12] als eine CF-verursachende Variante klassifiziert, während das Sosnay-Papier[13] die Variante als „unbestimmt" klassifiziert. Die Datenbankklassifizierung ist aktueller und spiegelt die Ergebnisse der Funktionstests wider, die zum Zeitpunkt der Sosnay-Veröffentlichung noch nicht verfügbar waren.

Verfahrensprinzipien

Der Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose umfasst zwei Hauptverfahren. Das erste Verfahren, die Bibliotheksvorbereitung, besteht im manuellen Vorbereiten der Proben für die Sequenzierung. Die Bibliotheksvorbereitung besteht aus vier wichtigen Schritten: Hybridisierung, Extension-Ligation, PCR-Amplifikation und Bibliotheksnormalisierung. Das zweite Verfahren ist das Sequenzieren der vorbereiteten Probe mithilfe der SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis) auf dem MiSeqDx-Gerät.

Bibliotheksvorbereitung



A **Hybridisierung** – Im ersten Schritt, der Hybridisierung, wird ein Pool von Upstream- und Downstream-Oligonukleotiden, der spezifisch für den MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose ist, in die genomische DNA-Probe hybridisiert. Am Ende des Vorgangs entfernt ein Waschlauf in drei Schritten anhand eines Filters, der eine Größenauswahl vornehmen kann, ungebundene Oligonukleotide aus der genomischen DNA.

B **Extension-Ligation** – Im zweiten Schritt, der Extension-Ligation, werden die hybridisierten Upstream- und Downstream-Oligonukleotide verbunden. Eine DNA-Polymerase erstreckt sich von den Upstream-Oligonukleotiden über die Zielregion hinaus, gefolgt von der Ligation mit dem 5'-Ende des Downstream-Oligonukleotids mittels DNA-Ligase. Das Ergebnis besteht in der Bildung von Produkten, die die CF-spezifischen Oligonukleotide enthalten, flankiert von Sequenzen, die für die Amplifikation benötigt werden.

C **PCR-Amplifikation** – Im dritten Schritt, der PCR-Amplifikation, werden die Extension-Ligation-Produkte unter Verwendung von Primern, die Indexsequenzen für die Proben-Multiplexierung hinzufügen, sowie von gängigen

Adaptern, die für die Clusterbildung auf dem MiSeqDx-Gerät erforderlich sind, amplifiziert. Am Ende dieses Vorgangs reinigt ein PCR-Reinigungsverfahren die PCR-Produkte (die als Bibliothek bezeichnet werden).

D **Bibliotheksnormalisierung** – Im letzten Schritt, der Bibliotheksnormalisierung, wird die Quantität jeder Bibliothek normalisiert, um eine einheitlichere Bibliotheksdarstellung in der endgültigen Pool-Bibliothek sicherzustellen. Am Ende dieses Vorgangs wird die Pool-Bibliothek zur Sequenzierung mit der SBS-Chemie auf das MiSeqDx-Gerät geladen.

Sequenzierung

Die SBS-Chemie verwendet eine Methode mit reversiblen Terminatoren, um einzelne Nukleotidbasen zu erkennen, die in wachsende DNA-Stränge eingebaut sind. Während eines Sequenzierungszyklus wird ein einzelnes, mit Fluoreszenzfarbstoff markiertes Desoxynukleotid-Triphosphat (dNTP) zur Nukleotid-Säurekette hinzugefügt. Die Nukleotid-Kennzeichnung dient als Terminator für die Polymerisation, d. h. nach jeder dNTP-Inkorporation wird der Fluoreszenzfarbstoff bildlich erfasst, um die Base zu identifizieren, und dann enzymatisch gespalten, um die Inkorporation des nächsten Nukleotids zu ermöglichen. Da alle vier an reversible Terminatoren gebundenen dNTPs (A, G, T, C) als einzelne, separate Moleküle vorhanden sind, werden Integrationsfehler durch natürliche Wettbewerbsmechanismen minimiert. Base-Calls erfolgen bei jedem Sequenzierungszyklus direkt anhand von Signalstärkemessungen. Das Endergebnis ist eine Base für Base erfolgende Sequenzierung.

Datenanalyse

MiSeq Reporter verarbeitet die im Rahmen der Primäranalyse generierten Base-Calls und liefert basierend auf den Angaben im Probenblatt Informationen zu jeder Probe. Dieser Schritt wird Sekundäranalyse genannt. Die Sekundäranalyse umfasst die Demultiplexierung, die FASTQ-Dateigenerierung, das Alignment, das Varianten-Calling und das Generieren von VCF-Dateien, die Informationen zu CFTR-Varianten enthalten, die an speziellen Positionen im Referenzgenom gefunden wurden.

- **Demultiplexierung** – Dies ist der erste Schritt der Sekundäranalyse, wenn im Probenblatt mehrere Proben aufgelistet sind und der Lauf über Index-Reads verfügt. Die Demultiplexierung trennt Daten aus zusammengefassten Proben auf der Basis der eindeutigen Sequenzindizes, die während der PCR-Amplifikation hinzugefügt wurden.
- **Generieren von FASTQ-Dateien** – Nach der Demultiplexierung generiert MiSeq Reporter temporäre Dateien im FASTQ-Dateiformat, dem Textformat für die Darstellung von Sequenzen. FASTQ-Dateien enthalten die Reads für jede Probe sowie die Qualitäts-Scores (ausgenommen Reads von Clustern, die den Filter nicht passiert haben.
- **Alignment** – Beim Alignment werden Sequenzen mit der Referenz verglichen, um eine Beziehung zwischen den Sequenzen zu identifizieren. Außerdem wird ein Score basierend auf Ähnlichkeitsregionen zugewiesen. Ausgerichtete Reads werden in Dateien im BAM-Format gespeichert. MiSeq Reporter verwendet einen „banded“ Smith-Waterman-Algorithmus, der lokale Sequenz-Alignments durchführt, um ähnliche Regionen zwischen zwei Sequenzen zu ermitteln.
- **Varianten-Calling** – Bei diesem Schritt werden einzelne Nukleotidvarianten (SNVs), Insertionen und Deletionen (Indels) und weitere strukturierte Varianten in einer standardisierten Textdatei mit dem Namen MiSeqDxCF139VariantAssay.txt aufgezeichnet. Weitere Informationen hierzu finden Sie im Abschnitt „Analyseberichtsdatei“ im *MiSeq Reporter – Benutzerhandbuch (Teile-Nr. 15038356)*.

Einschränkungen des Verfahrens

1. Für *In-Vitro*-Diagnostik. Die mit dem Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose erzielten Ergebnisse sollten im Kontext einer vollständigen klinischen Bewertung verwendet und interpretiert werden.
2. Der Assay wurde entwickelt, um eine spezifische Untergruppe bekannter Varianten im *CFTR*-Gen zu identifizieren, umfasst jedoch nicht alle Varianten, die im *CFTR*-Gen identifiziert wurden. Wenn eine Variante nicht identifiziert wird, ist dies jedoch keine Garantie dafür, dass keine anderen *CFTR*-Varianten in den analysierten Proben vorhanden sind.

3 Die Häufigkeit der von diesem Assay ermittelten Varianten ist je nach Bevölkerungsgruppe unterschiedlich.
4 Wie bei jedem auf Hybridisierung basierenden Assay können zugrundeliegende Polymorphismen oder Varianten in Oligonukleotid-bindenden Regionen die untersuchten Allele und somit die Anzahl der Calls beeinträchtigen.
5 Der Assay kann nicht feststellen, ob die Ausrichtung der PolyTG/PolyT-Variante cis/trans zur R117H-Variante ist. Bei Patienten mit einer R117H-Variante sollten weitere Tests durchgeführt werden, um festzustellen, ob sich eine PolyTG/PolyT-Variante, die den klinischen Phänotyp [z. B. 12-13 (TG) oder 5T] beeinflussen kann, in cis/trans-Ausrichtung zur R117H-Variante befindet.
6 PolyTG/PolyT sind Homopolymer-Regionen, die bei sequenzbasierten Assays aufgrund des Verrutschens der DNA-Polymerase (Slippage) bekanntermaßen schwer zu interpretieren sind. Eine Miscall-Rate von 0,9 % (4/448) wurde bei PolyTG/PolyT-Ergebnissen beobachtet, was eine Diskrepanz von ±1 TG im Vergleich zur bidirektionalen Sanger-Sequenzierung zeigt (Tabelle 17).

Produktkomponenten

Die Illumina MiSeqDx-Plattform umfasst folgende Komponenten:

- MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose (Katalognummer DX-102-1004 or DX-102-1003)
- MiSeqDx-Gerät (Katalognummer DX-410-1001)

Reagenzien

Bereitgestellte Reagenzien

Reagenzien für den Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose werden von Illumina bereitgestellt. Katalognummer DX-102-1003 wurde für 20 Läufe mit maximal 48 Proben pro Lauf (insgesamt bis zu 960 Proben) konfiguriert. Katalognummer DX-102-1004 wurde für zwei Läufe mit maximal 48 Proben pro Lauf (insgesamt bis zu 96 Proben) konfiguriert.

MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose, Karton 1

Tabelle 3 Karton 1A Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge		Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
	DX-102-1003	DX-102-1004			
CF-139-Varianten-Oligo-Pool	10 Röhrchen	1 Röhrchen	600 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Oligonukleotiden, die auf das *CFTR*-Gen abzielen	-25 °C bis -15 °C
Hybridisierungspuffer	10 Röhrchen	1 Röhrchen	4,32 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und Formamid	-25 °C bis -15 °C
Extension-Ligation-Mischung	10 Röhrchen	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit einer proprietären Mischung aus DNA-Polymerasen, DNA-Ligasen und dNTPs	-25 °C bis -15 °C
Index-Primer A (A501) - H (A508)	10 Röhrchen pro Primer	1 Röhrchen pro Primer	192 µl	PCR-Primer mit Indexsequenzen und Sequenzierungsadaptern	-25 °C bis -15 °C
Index-Primer 1 (A701) - 12 (A712)	10 Röhrchen pro Primer	1 Röhrchen pro Primer	128 µl	PCR-Primer mit Indexsequenzen und Sequenzierungsadaptern	-25 °C bis -15 °C
PCR-Polymerase	10 Röhrchen	1 Röhrchen	56 µl	Proprietäre DNA-Polymerase	-25 °C bis -15 °C
PCR-Master-Mischung	10 Röhrchen	1 Röhrchen	2,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und dNTPs	-25 °C bis -15 °C

Tabelle 4 Karton 1B Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge		Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Bibliotheks-normalisierungs-verdünner	10 Röhrchen	1 Röhrchen	4,6 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	-25 °C bis -15 °C
Bibliothek-Verdünnungs-puffer	10 Röhrchen	1 Röhrchen	4,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung	-25 °C bis -15 °C
Interne PhiX-Kontrolle	1 Röhrchen	1 Röhrchen	10 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit genomischer PhiX-DNA	-25 °C bis -15 °C

MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose, Karton 2

Tabelle 5 Karton 2 Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge		Inhalt	Lagerung
	DX-102-1003	DX-102-1004		
MiSeqDx-Reagenzienkartusche - CF-139-Varianten-Assay	20 Kartuschen	2 Kartuschen	Einweg-Kartusche mit Clusterbildungs- und Sequenzierungsreagenzien für die Verwendung mit dem MiSeqDx-Gerät, einschließlich Formamid, 2-Mercaptoethanol und 2 % DMSO	-25 °C bis -15 °C

MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose, Karton 3

Tabelle 6 Karton 3A Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge		Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Stringenter Wasch-Puffer	10 Flaschen	1 Flasche	24 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	2 °C bis 8 °C
Universeller Wasch-Puffer	10 Röhrchen	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 °C bis 8 °C

Tabelle 7 Karton 3B Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge		Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
	DX-102-1003	DX-102-1004			
PCR-Reinigungs-Beads	10 Röhrchen	1 Röhrchen	5 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festphasigen paramagnetischen Beads und Polyethylenglykol	2 °C bis 8 °C
Bibliotheks-normalisierungs-Wasch-Puffer	20 Röhrchen	2 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	2 °C bis 8 °C
Bibliothek-Beads	10 Röhrchen	1 Röhrchen	1,2 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festphasigen paramagnetischen Beads	2 °C bis 8 °C
MiSeqDx-Fließzelle - CF-139-Varianten-Assay	20 Behälter	2 Behälter	1 Fließzelle	Glassubstrat mit kovalent gebundenen Oligonukleotiden	2 °C bis 8 °C

MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose, Karton 4

Tabelle 8 Karton 4 Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge		Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
	DX-102-1003	DX-102-1004			
MiSeqDx-SBS-Lösung (PR2) - CF-139-Varianten-Assay	20 Flaschen	2 Flaschen	353,1 ml	Gepufferte wässrige Lösung	2 °C bis 8 °C

MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose, Karton 5

Tabelle 9 Karton 5 Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge		Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Filterplatte	20 Platten	2 Platten	Nicht zutreffend	Polypropylen-Mikrotiterplatte mit einer modifizierten Polyethersulfonmembran	15 °C bis 30 °C

Tabelle 10 Karton 5 Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge		Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
	DX-102-1003	DX-102-1004			
Elutionspuffer	10 Röhrchen	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung	15 °C bis 30 °C
Bibliothek-Lagerungspuffer	10 Röhrchen	1 Röhrchen	3,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung	15 °C bis 30 °C

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Reagenzien

Voramplifikationsreagenzien

- 10 N NaOH (aus Tabletten herstellen oder Standardlösung verwenden)
- TE-Puffer
- DNase- und RNase-freies Wasser

Nachamplifikationsreagenzien

- 10 N NaOH (aus Tabletten herstellen oder Standardlösung verwenden)
- Ethanol absolut für die Molekularbiologie
- TE-Puffer
- DNase- und RNase-freies Wasser

Lagerung und Handhabung

1. Die Raumtemperatur ist mit 15 °C bis 30 °C definiert.
2. Die folgenden Reagenzien werden gefroren ausgeliefert und sind stabil, wenn sie bis zum angegebenen Verfallsdatum bei -25 °C bis -15 °C gelagert werden.
   - CF-139-Varianten-Oligo-Pool
   - Hybridisierungspuffer
   - Extension-Ligation-Mischung
   - Index-Primer A (A501) - H (A508)
   - Index-Primer 1 (A701) - 12 (A712)
   - PCR-Polymerase
   - PCR-Master-Mischung

- Bibliotheksnormalisierungsverdünner
- Bibliothek-Verdünnungspuffer
- Interne PhiX-Kontrolle
- MiSeqDx-Reagenzienkartusche - CF-139-Varianten-Assay

Mit Ausnahme der Reagenzienkartusche sind die Reagenzien für maximal 6 vor dem angegebenen Verfallsdatum durchgeführte Gefrier/Auftau-Zyklen stabil.

Frieren Sie die Reagenzienkartusche nicht mehr ein, nachdem sie aufgetaut wurde. Sie kann bei 2 bis 8 °C bis zu sechs Stunden lang gelagert werden.

3 Die folgenden Reagenzien werden gekühlt ausgeliefert und sind stabil, wenn sie bis zum angegebenen Verfallsdatum bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
- Stringenter Wasch-Puffer
- Universeller Wasch-Puffer
- PCR-Reinigungs-Beads
- Bibliothek-Beads
- Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer
- MiSeqDx-SBS-Lösung (PR2) - CF-139-Varianten-Assay
- MiSeqDx-Fließzelle - CF-139-Varianten-Assay

4 Die folgenden Reagenzien werden in Umgebungstemperatur ausgeliefert und sind stabil, wenn sie bei Raumtemperatur bis zum angegebenen Verfallsdatum gelagert werden.
- Elutionspuffer
- Filterplatte
- Bibliothek-Lagerungspuffer

5 Änderungen an der physischen Struktur der bereitgestellten Reagenzien kann auf eine Schädigung der Materialien hindeuten. Verwenden Sie die Reagenzien nicht, wenn Änderungen an der physischen Struktur auftreten (z. B. offensichtliche Veränderungen der Reagenzienfarbe oder Eintrübung mit offenkundiger Keimkontamination).

6 Die Reagenzien Hybridisierungspuffer, Stringenter Wasch-Puffer und Bibliotheksnormalisierungsverdünner können sichtbare Ausfällungen oder Kristalle bilden. Mischen Sie vor der Verwendung kräftig mit dem Vortexer und stellen Sie anschließend visuell sicher, dass keine Ausfällungen vorhanden sind.

7 Beachten Sie die folgenden Best Practices beim Umgang mit PCR-Reinigungs-Beads und Bibliothek-Beads:
- Die Beads dürfen niemals eingefroren werden.
- Die Beads sollten Raumtemperatur haben.
- Mischen Sie die Beads unmittelbar vor der Verwendung mit dem Vortexer, bis sie gut suspendiert sind und die Farbe homogen erscheint.
- Mischen Sie die Probe nach dem Hinzufügen der Beads gründlich, indem Sie zehnmal auf- und abpipettieren. Die Proben können auch mit einem Schüttler sorgfältig gemischt werden.
- Inkubieren Sie die Bead/Probenmixtur bei Raumtemperatur für die gesamte angegebene Dauer.
- Folgen Sie den Anweisungen, wenn Sie das Magnetstativ verwenden. Warten Sie, bis die Lösung klar ist, bevor Sie aspirieren. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ, wenn Sie den Überstand langsam aspirieren. Achten Sie dabei darauf, dass die separierten Beads nicht durcheinandergebracht werden.

8 Die PCR-Amplifikationsplatte kann über Nacht auf dem Thermocycler bleiben oder bei 2 °C bis 8 °C bis zu zwei Tage lang gelagert werden. Versiegeln Sie vor dem Lagern der Platte bei 2 °C bis 8 °C den Platten-Well.

9 Frieren Sie die Bibliothek-Beads nicht ein bzw. vermischen Sie sie nicht mit dem Bibliotheksnormalisierungsverdünner-Reagenz, wenn sie nicht sofort verwendet werden.

10 Die vollständige Bibliotheksnormalisierungsplatte kann bei -25 °C bis -15 °C bis zu 3 Tage lang gelagert werden.

11 Die Pooled Amplicon Library (PAL) kann bei -25 °C bis -15 °C bis zu 3 Tage lang gelagert werden.

12 Laden Sie den frisch vorbereiteten, verdünnten Amplikon-Pool sofort in die Reagenzienkartusche.
Die Lagerung des verdünnten Amplikon-Pools kann zu einer signifikanten Verringerung der Clusterdichte führen.

Geräte und Materialien

Bereitgestellte, separat erhältliche Geräte und Materialien

1 **MiSeqDx Gerät**, Katalognummer DX-410-1001
2 **TruSeq-Indexplattenvorrichtungs-Kit**, Katalognummer FC-130-1005
3 **TruSeq-Indexplattenvorrichtungs- und -Kranz-Kit,**, Katalognummer FC-130-1007
4 **Ersatzverschlüsse für Indexadapter**, Katalognummer DX-502-1003

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

Geräte und Materialien für die Voramplifikation

1 **Hitzeblock** – Es wird ein Hitzeblock für eine 96-Well-Platte benötigt. Der Hitzeblock muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen. Hitzeblöcke mit beheizten Deckeln sind zur Verwendung akzeptabel.
   — Temperaturbereich: Umgebung +5 °C bis 99 °C
   — Temperatursteuerung: ±0,1 °C bei 37 °C; ±0,4 °C bei 60 °C
2 **Probeninkubator** – Es wird ein Inkubator (Hybridisierungsofen) benötigt. Der Inkubator muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen.
   — Temperaturbereich: 10 °C bis 100 °C
   — Temperatursteuerung: ±0,2 °C
3 **Tischzentrifuge** – Es wird eine Tischzentrifuge benötigt, die die Temperatur von 20 °C halten kann. (Es wird eine separate Zentrifuge im Nachamplifikationsbereich benötigt.) Es kann jede Plattenzentrifuge verwendet werden, die die vorgesehenen Geschwindigkeiten des Protokolls erreicht (280 bis 2400 x g).
4 **Präzisionspipetten** – Es wird ein Satz Präzisionspipetten benötigt. (Es wird ein separater Satz im Nachamplifikationsbereich benötigt.) Die Verwendung von Präzisionspipetten ist notwendig, um eine genaue Reagenz- und Probenabgabe zu gewährleisten. Es können Einzel- oder Mehrkanalpipetten verwendet werden, wenn sie regelmäßig kalibriert werden und ihre Genauigkeit innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegt.
5 **Verbrauchsmaterialien** – Die folgenden Verbrauchsmaterialien werden benötigt.
   — 96-Well-PCR-Platten mit Rahmen, 0,2 ml, Polypropylen oder vergleichbar
   HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass die 96-Well-Platte zum Magnetstativ passt.
   — 96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platten)
   — Lösungsbecken, PVC, DNase-/RNase-frei (Bottich)
   — Klebende Aluminiumfolienversiegelung
   — Entsprechende PCR-Plattenversiegelung
   — Aerosol-resistente Pipettenspitzen

Geräte und Materialien für die Nachamplifikation

1 **Thermocycler** – Es wird ein Thermocycler benötigt. Der Thermocycler muss einen beheizbaren Deckel besitzen und den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen:
   — Temperatursteuerungsbereich: 4 °C bis 99 °C
   — Steuerungsgenauigkeit: ±0,25 °C von 35 °C bis 99 °C
2 **Mikroplattenschüttler** – Es wird ein Mikroplattenschüttler im Nachamplifikationsbereich des Labors benötigt. Der Plattenschüttler muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen:
   — Maximale Mischgeschwindigkeit: 3.000 rpm
   — Mischgeschwindigkeitsbereich: 200 bis 3.000 rpm

3 **Tischzentrifuge** – Es wird eine Tischzentrifuge benötigt, die die Temperatur von 20 °C halten kann. (Es wird eine separate Zentrifuge im Voramplifikationsbereich benötigt.) Es kann jede Plattenzentrifuge verwendet werden, die die vorgesehenen Geschwindigkeiten des Protokolls erreicht (280 bis 2400 x g).
4 **Hitzeblock** – Es wird ein Hitzeblock für Röhrchen benötigt. Der Hitzeblock muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen.
   — Temperaturbereich: Umgebung +5 bis 99 °C
   — Temperatursteuerung: ±0,1 °C bei 37 °C; ±0,4 °C bei 60 °C
5 **Magnetstativ** – Es wird ein Magnetstativ für eine 96-Well-Platte benötigt. Die Leistung ist besser, wenn sich die Magnete an der Seite des Stativs und nicht am Boden befinden.
6 **Präzisionspipetten** – Es wird ein Satz Präzisionspipetten benötigt. (Es wird ein separater Satz im Voramplifikationsbereich benötigt.) Die Verwendung von Präzisionspipetten ist notwendig, um eine genaue Reagenz- und Probenabgabe zu gewährleisten. Es können Einzel- oder Mehrkanalpipetten verwendet werden, wenn sie regelmäßig kalibriert werden und ihre Genauigkeit innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegt.
7 **Verbrauchsmaterialien** – Die folgenden Verbrauchsmaterialien werden benötigt.
   — 96-Well-PCR-Platten mit Rahmen, 0,2 ml, Polypropylen oder vergleichbar
     HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass die 96-Well-Platte zum Magnetstativ passt.
   — 96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platten)
   — Konische 15-ml-Röhrchen
   — Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen (Schraubverschluss empfohlen)
   — PCR-8-fach-Röhrchenstreifen
   — Lösungsbecken, PVC, DNase-/RNase-frei (Bottich)
   — Klebende Aluminiumfolienversiegelung
   — Klebende Plattenversiegelung
   — Aerosol-resistente Pipettenspitzen

Sammeln, Transportieren und Lagern von Proben

ANMERKUNG
Behandeln Sie alle Proben wie potenzielle Infektionserreger.

1 Vollblutproben, die in K_2EDTA-Röhrchen gesammelt wurden, können verwendet werden.
2 Vollblutproben können bei Raumtemperatur maximal sieben Tage, bis zu 30 Tage bei 2 °C bis 8 °C oder gefroren bei -25 °C bis -15 °C bis zu 30 Tage lang gelagert werden.
3 Transportieren Sie Vollblut bei Raumtemperatur maximal sieben Tage lang, bei 2 °C bis 8 °C maximal 30 Tage lang oder gefroren bei -25 °C bis -15 °C maximal 30 Tage lang. Beim Transport von Vollblut müssen die länderspezifischen, Bundes-, staatlichen und regionalen Vorschriften für den Transport von Krankheitserregern eingehalten werden.
4 Nach dem sechsmaligen Einfrieren und Auftauen von genomischer DNA wurden keine negativen Auswirkungen auf die Assay-Leistung beobachtet.
5 Bei Vollblutproben mit erhöhten Bilirubin-, Cholesterin-, Hämoglobin-, Triglycerid- bzw. EDTA-Werten wurden keine negativen Auswirkungen auf die Assay-Leistung beobachtet.

Warn- und Vorsichtshinweise

ACHTUNG!
Gemäß geltender Gesetze ist der Verkauf oder die Nutzung dieses Geräts nur über einen Arzt bzw. im Auftrag eines Arztes oder einer anderen Fachperson mit entsprechender Lizenz zulässig.

1 Einige Komponenten dieses Assays enthalten Formamid, ein aliphatisches Amid, das in Verdacht steht, ein fortpflanzungsgefährdendes Toxin zu sein. (Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Reagenzien* auf

Seite 6.) Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Behälter und nicht verwendeter Inhalt müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften Ihrer Region entsorgt werden. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.

2 Einige Komponenten dieses Assays enthalten das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol. (Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Reagenzien* auf Seite 6.) Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Die Verwendung muss in einem gut belüfteten Bereich stattfinden und alle Behälter und nicht verwendeten Inhalte müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften Ihrer Region entsorgt werden. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.

3 Behandeln Sie alle Proben wie potenzielle Infektionserreger.

4 Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer wesentlichen Abnahme der Probenqualität führen.

5 Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie bei der Handhabung von Proben und Assay-Reagenzien Einweg-Handschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach der Handhabung von Proben und Assay-Reagenzien gründlich die Hände.

6 Verwenden Sie Assay-Komponenten nicht mehr nach ihrem auf dem Etikett des Assay-Kartons angegebenen Verfallsdatum. Tauschen Sie Assay-Komponenten aus unterschiedlichen Assay-Chargen nicht gegeneinander aus. Beachten Sie, dass die Assay-Charge auf dem Etikett des Assay-Kartons angegeben ist.

7 Lagern Sie die Assay-Komponenten bei der angegebenen Temperatur in ausgewiesenen Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereichen.

8 Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen (bis zu sechsmal) der Komponenten aus Karton 1 beeinträchtigt die Integrität des Assays nicht.

9 Um eine Zersetzung der Proben oder Reagenzien zu verhindern, stellen Sie sicher, dass alle Natriumhypochloritdämpfe vollständig abgeführt wurden, bevor Sie das Protokoll starten.

10 Ordnungsgemäße Laborpraktiken und eine gute Laborhygiene sind unerlässlich, um eine Kontamination von Reagenzien, Instrumenten und genomischen DNA-Proben durch PCR-Produkte zu verhindern. Eine Kontamination durch PCR-Produkte kann zu falschen und unzuverlässigen Ergebnissen führen.

11 Stellen Sie zur Verhinderung einer Kontamination sicher, dass die Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereiche über eigene Geräte (z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Vortexer und Zentrifuge) verfügen.

12 Vermeiden Sie eine Kreuzkontamination. Verwenden Sie nach jeder Probe und nach der Abgabe von Reagenzien jeweils frische Pipettenspitzen. Mischen Sie Proben mit einer Pipette und zentrifugieren Sie die Platte, wenn dies angegeben ist. Mischen Sie die Platten nicht mit dem Vortexer. Die Verwendung von Aerosol-resistenten Spitzen verringert das Risiko einer Amplikon-Übertragung und einer Kreuzkontamination von Probe zu Probe.

13 Die Index-Proben-Paarung muss genau dem Probenblatt entsprechen. Abweichungen zwischen dem Probenblatt und dem Plattenlayout führen zu einem Verlust der positiven Probenidentifikation und fehlerhaften Ergebnisberichten.

14 Bereiten Sie stets frisches 80%iges Ethanol für die Schritte des Waschlaufs zu. Ethanol kann Wasser aus der Luft aufnehmen, was die Ergebnisse verfälscht.

15 Stellen Sie sicher, dass während der Waschschritte das gesamte Ethanol vom Boden der Wells entfernt wird. Ethanolreste können die Ergebnisse beeinträchtigen.

16 Halten Sie nach dem Magnetstativ-Schritt die angegebene Trockenzeit ein, um eine vollständige Evaporation sicherzustellen. Ethanolreste können den Ablauf nachfolgender Reaktionen beeinträchtigen.

17 Mischen Sie den CF-139-Varianten-Oligo-Pool und den Hybridisierungspuffer nicht zum Lagern. Wenn diese vermischt werden, wird der CF-139-Varianten-Oligo-Pool selbst bei Gefrierlagerung instabil.

18 Die Verwendung von Thermocyclern mit aktiver Abkühlung (z. B. Peltier, thermoelektrisch gekühlt) wird für den Hybridisierungsschritt nicht empfohlen. Der Schritt der passiven Abkühlung ist für eine ordnungsgemäße Hybridisierung ausschlaggebend.

19 Fügen Sie PCR-Polymerase immer erst direkt vor dem Gebrauch zur PCR-Master-Mischung hinzu. Bewahren Sie die kombinierte Gebrauchslösung niemals auf.
20 Während des Bibliotheksnormalisierungsschritts ist es äußerst wichtig, das Bibliothek-Bead-Pellet vollständig zu resuspendieren. Dies ist unerlässlich, um eine konsistente Clusterdichte auf der MiSeqDx-Fließzelle zu erzielen.
21 Halten Sie beim Bibliotheksnormalisierungsschritt die angegebenen Inkubationszeiten ein. Eine unsachgemäße Inkubation kann die Bibliotheksdarstellung und die Clusterdichte beeinträchtigen.
22 Aufgrund der Anzahl an Plattenübertragungen und dem sich daraus ergebenden Kontaminationspotenzial müssen Sie äußerste Vorsicht walten lassen, um sicherzustellen, dass der Well-Inhalt vollständig im Well verbleibt. Passen Sie auf, dass der Inhalt nicht verspritzt wird.
23 Die Empfehlung zur Zugabe von 250 ng DNA ermöglicht die DNA-Mengenvariation. Die Leistung des Assays wird durch diese Zugabestufe erhöht.
24 Probenvarianten mit einer „No Call"-Angabe im Testbericht weisen darauf hin, dass die Daten für diese Variantenposition die definierten Sequenzierungsgrenzwerte nicht erreicht haben. Probenvarianten mit einer „No Call"-Angabe dürfen nicht gemeldet werden, es sei denn, bei Wiederholungstests werden die definierten Grenzwerte erreicht, sodass die Probenvarianten nicht mehr als „No Call" eingestuft werden.

Verfahrenshinweise

1 Illumina verlangt, dass jeder Lauf, der als parallel zu verarbeitender Satz an Proben definiert ist, eine positive Kontroll-DNA-Probe und eine negative Kontrollprobe (NTC oder No Template Control) enthält. Die positive Kontroll-DNA-Probe muss eine gut charakterisierte Probe mit einer oder mehreren bekannten *CFTR*-Varianten sein. Illumina empfiehlt die Verwendung einer Wildtyp-Kontrollprobe. Die Wildtyp-Kontrollprobe sollte als eine Probe ausgeführt werden und nicht die positive oder negative Kontrollprobe ersetzen.
2 Bevor Sie mit dem MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose beginnen, extrahieren und quantifizieren Sie die DNA.
3 Sie können hierfür ein beliebiges validiertes DNA-Extraktionsverfahren verwenden.
4 Quantifizieren Sie die DNA mit einem Spektralphotometer. Vergewissern Sie sich, dass das A260/A280-Verhältnis der DNA-Probe > 1,5 ist. Normalisieren Sie die DNA-Probe auf 50 ng/µl. Jede Probe muss 5 µl genomische DNA (insgesamt 250 ng) enthalten.

Probendurchsatz und Indexdarstellung

Beim Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose beträgt der Probendurchsatz pro MiSeqDx-Lauf zwischen 8 und 48 Proben. Die während der PCR-Amplifikation verwendeten Index-Primer müssen auf Basis des gewünschten endgültigen Probendurchsatzes ausgewählt werden, damit Diversität in der Indexsequenz sichergestellt ist.

ANMERKUNG
Um eine maximale Effizienz beim Durchsatz zu erzielen, führen Sie die Bibliotheksvorbereitung für bis zu 96 Proben durch und teilen Sie die Proben dann in zwei Sequenzierungsläufe mit maximal 48 Proben pro Lauf auf.

MiSeqDx verwendet eine grüne LED zum Sequenzieren von G/T-Basen und eine rote LED zum Sequenzieren von A/C-Basen. Um eine ordnungsgemäße Registrierung sicherzustellen, muss in jedem Zyklus mindestens eines der zwei Nukleotide für jeden Farbkanal gelesen werden. Es ist wichtig, die Farbbalance für jede Base des sequenzierten Index-Reads zu halten. Anderenfalls kann bei der Sequenzierung des Index-Reads ein Registrierungsfehler auftreten.

Siehe Tabelle 11 für die Auswahl von Index-Primer-Kombinationen für 48 oder 96 Probenläufe.

Tabelle 11 Index-Primer-Kombinationen für 48-Proben- oder 96-Proben-Sequenzierungsläufe

Zeilen A–H	Spalten 1–6	Spalten 7-12
Index-Primer A (A501)	Index-Primer 1 (A701)	Index-Primer 6 (A706)

Zeilen A–H	Spalten 1–6	Spalten 7-12
Index-Primer B (A502)	Index-Primer 2 (A702)	Index-Primer 7 (A707)
Index-Primer C (A503)	Index-Primer 3 (A703)	Index-Primer 8 (A708)
Index-Primer D (A504)	Index-Primer 4 (A704)	Index-Primer 9 (A709)
Index-Primer E (A505)	Index-Primer 5 (A705)	Index-Primer 11 (A711)
Index-Primer F (A506)	Index-Primer 10 (A710)	Index-Primer 12 (A712)
Index-Primer G (A507)	--	--
Index-Primer H (A508)	--	--

Wenn Sie weniger als 48 Proben in einem Sequenzierungslauf sequenzieren, wählen Sie die entsprechenden Indizes anhand ihrer Sequenzen aus, damit die Farbbalance in den grünen und roten Kanälen aufrechterhalten wird. Weitere Informationen hierzu finden Sie in Tabelle 13 und Tabelle 14. Läufe mit 8 bis 48 Proben müssen mindestens die Index-Primer-Kombinationen enthalten, die in Tabelle 12 aufgeführt sind.

Um kleinere Läufe präzise zu verarbeiten, müssen mindestens acht Proben vorhanden sein. Wenn keine sechs eindeutigen Proben (ausgenommen die positiven und negativen Kontrollen) verfügbar sind, ist es akzeptabel, den Lauf mit Probenreplikaten von humangenomischen DNA-Proben aufzufüllen. Siehe Tabelle 12 für den minimalen Satz an Indizes mit Farbbalance, die für Sequenzierungsläufe mit acht Proben zu verwenden sind.

Tabelle 12 Index-Primer-Kombinationen für 8-Proben-Sequenzierungsläufe

	Index-Primer 1 (A701)	Index-Primer 2 (A702)	Index-Primer 10 (A710)
Index-Primer C (A503)	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Index-Primer D (A504)	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Index-Primer E (A505)	Probe 7	Probe 8	--

Index-Primer-Sequenzen

Tabelle 13 Sequenzen für Index-Primer A (A501) - H (A508)

Index-Primer	Sequenz
Index-Primer A (A501)	TGAACCTT
Index-Primer B (A502)	TGCTAAGT
Index-Primer C (A503)	TGTTCTCT
Index-Primer D (A504)	TAAGACAC
Index-Primer E (A505)	CTAATCGA
Index-Primer F (A506)	CTAGAACA
Index-Primer G (A507)	TAAGTTCC
Index-Primer H (A508)	TAGACCTA

Tabelle 14 Sequenzen für Index-Primer 1 (A701) - 12 (A712)

Index-Primer	Sequenz
Index-Primer 1 (A701)	ATCACGAC
Index-Primer 2 (A702)	ACAGTGGT

Index-Primer	Sequenz
Index-Primer 3 (A703)	CAGATCCA
Index-Primer 4 (A704)	ACAAACGG
Index-Primer 5 (A705)	ACCCAGCA
Index-Primer 6 (A706)	AACCCCTC
Index-Primer 7 (A707)	CCCAACCT
Index-Primer 8 (A708)	CACCACAC
Index-Primer 9 (A709)	GAAACCCA
Index-Primer 10 (A710)	TGTGACCA
Index-Primer 11 (A711)	AGGGTCAA
Index-Primer 12 (A712)	AGGAGTGG

Gebrauchsanweisung

MiSeqDx Probenblattvorbereitung

1 Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm von Illumina Worklist Manager (IWM) die Option **Create Worklist** (Arbeitsliste erstellen).
2 Wählen Sie im Feld „Test Type“ (Testtyp) die Option **CF-139-Varianten-Assay** aus.
3 Geben Sie im Feld „Worklist Name“ (Name der Arbeitsliste) einen Namen für das Probenblatt ein.
   — Wenn für den Namen des Probenblatts die alphanumerische Barcode-ID der Reagenzienkartusche verwendet wird, findet die MiSeq Operating Software (MOS) das Probenblatt automatisch.
   — Wenn ein anderer Name für das Probenblatt verwendet wird, kann die Schaltfläche **Browse** (Durchsuchen) in der MiSeq Operating Software (MOS) verwendet werden, um das entsprechende Probenblatt zu finden.
4 [Optional] Geben Sie eine Beschreibung für den Lauf ein.
5 Stellen Sie sicher, dass das Datum mit dem Startdatum des Laufs übereinstimmt.
6 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Eingeben von Probeninformationen

1 Geben Sie auf der Registerkarte „Table“ (Tabelle) oder „Plate“ (Platte) für jeden Probenwell folgende Informationen ein:
   a **Sample ID** (Proben-ID) – Geben Sie eine eindeutige Proben-ID ein.
   b **Index 1 and Index 2** (Index 1 und Index 2) – Geben Sie den Indexadapter an, der für jedes Index-Read verwendet werden soll.
2 [Optional] Um detailliertere Informationen zu den Proben aufzuzeichnen, geben Sie einen Probennamen und eine Beschreibung ein.
3 [Optional] Wählen Sie zum Angeben von Kontrollen auf der Platte im Dropdown-Menü **Control** (Kontrolle) „Negative“ (Negativ) bzw. „Positive“ (Positiv) aus.
4 Wechseln Sie zur Registerkarte „Plate Graphic“ (Plattengrafik) und verwenden Sie die Option **Copy to Clipboard** (In Zwischenablage kopieren) oder **Print** (Drucken), um ein Bild der Probenplatte zu erfassen.
5 Wählen Sie **Finish** (Fertig stellen).

Hybridisierung des Oligonukleotid-Pools

Vorbereitung

1 Bringen Sie den CF-139-Varianten-Oligo-Pool, den Hybridisierungspuffer, die genomischen DNA-Proben und die positive Kontrollprobe auf Raumtemperatur.
2 Mischen Sie den CF-139-Varianten-Oligo-Pool und den Hybridisierungspuffer kräftig, um sicherzustellen, dass sich alle Ablagerungen vollständig aufgelöst haben. Zentrifugieren Sie dann kurz die Röhrchen, um Flüssigkeit zu sammeln.
3 Erhitzen Sie einen 96-Well-Hitzeblock auf 95 °C.
4 Erwärmen Sie einen Inkubator auf 37 °C.
5 Erstellen Sie die Probenplatte entsprechend der von IWM ausgedruckten Plattengrafik.

Verfahren

1 Stellen Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte (nachstehend als **HYB**-Platte bezeichnet) bereit.
2 Fügen Sie 5 µl Probe oder Kontrolle bei 50 ng/µl (250 ng insgesamt) zu den entsprechenden Wells in der **HYB**-Platte hinzu. Folgen Sie dem generierten Plattenlayout, um eine korrekte Well-Auswahl vorzunehmen.
3 Fügen Sie 5 µl CF-139-Varianten-Oligo-Pool zu allen Wells hinzu, die genomische DNA enthalten.
4 Fügen Sie 40 µl Hybridisierungspuffer zu jeder Probe in der **HYB**-Platte hinzu. Pipettieren Sie drei- bis fünfmal leicht auf und ab, um zu mischen.
5 Verschließen Sie die **HYB**-Platte und zentrifugieren Sie 1000 × g eine Minute lang bei 20 °C.
6 Legen Sie die **HYB**-Platte in dem mit 95 °C vorgeheizten Block ab und inkubieren Sie sie eine Minute lang.
7 Verringern Sie die Temperatur des Hitzeblocks auf 40 °C und fahren Sie mit der Inkubation fort, bis der Hitzeblock 40 °C erreicht (etwa 80 Minuten).

   Die allmähliche Abkühlung ist für eine ordnungsgemäße Hybridisierung kritisch. Deshalb werden PCR-Thermocycler mit aktiver Kühlung (z. B. Peltier, thermoelektrisch gekühlt) für diesen Vorgang nicht empfohlen.

SICHERER HALTEPUNKT
Nachdem der Hitzeblock 40 °C erreicht hat, bleibt die **HYB**-Platte zwei Stunden lang bei 40 °C stabil.

Entfernen von ungebundenen Oligonukleotiden

Vorbereitung

1 Bringen Sie die Extension-Ligation-Mischung, stringenten Wasch-Puffer und universellen Wasch-Puffer auf Raumtemperatur und mischen Sie sie dann kurz mit dem Vortexer.
2 Fügen Sie die Filterplatten-Assembly-Einheit (nachfolgend **FPU** bezeichnet) in der entsprechenden Reihenfolge von oben nach unten zusammen: Deckel, Filterplatte, Adapterkranz und MIDI-Platte.
3 Waschen Sie die Filterplattenmembran vorab wie folgt:
   a Fügen Sie 45 µl stringenten Wasch-Puffer zu jedem Well hinzu.
   b Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie fünf Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.

Verfahren

1 Entfernen Sie die **HYB**-Platte aus dem Hitzeblock und zentrifugieren Sie sie eine Minute lang bei 1.000 x g und 20 °C.
2 Übertragen Sie das gesamte Volumen (etwa 55 µl) jeder Probe in die entsprechenden Wells der Filterplatte.
3 Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie fünf Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.

4 Waschen Sie die Filterplatte wie folgt:
   a Geben Sie 45 µl stringenten Wasch-Puffer in jeden Probe-Well.
   b Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie fünf Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.
5 Wiederholen Sie den Waschvorgang, wie im vorherigen Schritt beschrieben.

ANMERKUNG
Wenn der Wasch-Puffer nicht vollständig abläuft, zentrifugieren Sie erneut bei 2400 × g und 20 °C, bis die gesamte Flüssigkeit durchgelaufen ist (weitere fünf bis zehn Minuten).

6 Entsorgen Sie den gesamten Durchfluss (der Formamid enthält) und setzen Sie dann die **FPU** wieder zusammen.
7 Geben Sie 45 µl universellen Wasch-Puffer in jeden Probe-Well.
8 Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie zehn Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.

ANMERKUNG
Stellen Sie sicher, dass die gesamte Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren abgelaufen ist. Wiederholen Sie das Zentrifugieren bei Bedarf.

Extension-Ligation von gebundenen Oligonukleotiden

Verfahren

1 Fügen Sie 45 µl Extension-Ligation-Mischung zu jedem Probe-Well der Filterplatte hinzu.
2 Verschließen Sie die Filterplatte mit klebbarer Aluminiumfolie und decken Sie sie dann mit dem Deckel zu.
3 Inkubieren Sie die **FPU** im vorab erwärmten Inkubator 45 Minuten lang bei 37 °C.

PCR-Amplifikation

Vorbereitung

1 Bereiten Sie frisches 0,05 N NaOH vor.
2 Ermitteln Sie anhand des Plattengrafikausdrucks von Illumina Worklist Manager die zu verwendenden Index-Primer.
3 Bringen Sie die PCR-Master-Mischung und die entsprechenden Index-Primer auf Raumtemperatur. Mischen Sie mit dem Vortexer alle aufgetauten Röhrchen und zentrifugieren Sie sie anschließend kurz.
4 Stellen Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte (nachstehend als **AMP**-Platte bezeichnet) bereit.
5 Fügen Sie Index-Primer wie folgt zur AMP-Platte hinzu:
   a Fügen Sie 4 µl der ausgewählten Index-Primer [A (A501) – H (A508)] zum entsprechenden Well in einer Spalte der **AMP**-Platte hinzu.
   b Entsorgen Sie die ursprünglichen weißen Verschlüsse und bringen Sie neue weiße Verschlüsse an.
   c Fügen Sie 4 µl der ausgewählten Index-Primer [1 (A701) – 12 (A712)] zur entsprechenden Reihe der **AMP**-Platte hinzu. ***Die Spitzen müssen nach jeder Reihe ausgetauscht werden, um eine Index-Kreuzkontamination zu vermeiden.***
   d Entsorgen Sie die ursprünglichen orangefarbenen Verschlüsse und bringen Sie neue orangefarbene Verschlüsse an.
6 Bereiten Sie die PCR-Gebrauchslösung aus PCR-Master-Mischung/PCR-Polymerase wie folgt vor:
   a Fügen Sie für 96 Proben 56 µl PCR-Polymerase zu 2,8 ml PCR-Master-Mischung hinzu.
   b Invertieren Sie die vorbereitete PCR-Gebrauchslösung zum Mischen 20-mal.

   Die PCR-Gebrauchslösung ist bei Raumtemperatur 10 Minuten lang stabil.

Verfahren

1 Entnehmen Sie die **FPU** aus dem Inkubator und entfernen Sie die Aluminiumfolieversiegelung.

2 Verschließen Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie zwei Minuten lang bei 2400 x g und 20 °C.
3 Fügen Sie 25 µl 0,05 N NaOH zu jedem Probe-Well der Filterplatte hinzu. Pipettieren Sie das NaOH fünf- bis sechsmal auf und ab.
4 Decken Sie die Filterplatte ab und inkubieren Sie sie fünf Minuten lang bei Raumtemperatur.
5 Übertragen Sie während der Inkubation der Filterplatte 22 µl der PCR-Gebrauchslösung in jeden Well der AMP-Platte mit Index-Primern.
6 Übertragen Sie die vom Filter eluierten Proben wie folgt zur AMP-Platte:
   a Pipettieren Sie die Proben in der ersten Spalte der Filterplatte fünf- bis sechsmal auf und ab.
   b Übertragen Sie 20 µl von der Filterplatte zur entsprechenden Spalte der **AMP**-Platte.
   c Pipettieren Sie leicht fünf- bis sechsmal auf und ab, um die DNA mit der PCR-Gebrauchslösung gründlich zu mischen.
   d Übertragen Sie in ähnlicher Weise die verbleibenden Spalten von der Filterplatte zur AMP-Platte. ***Die Spitzen müssen nach jeder Spalte ausgetauscht werden, um Index- und Probenkreuzkontaminationen zu vermeiden.***
7 Versiegeln Sie die **AMP**-Platte und sichern Sie den Verschluss mit einer Gummiwalze.
8 Zentrifugieren Sie eine Minute lang bei 1000 × g und 20 °C.
9 Übertragen Sie die AMP-Platte in den Nachamplifikationsbereich.
10 Führen Sie mithilfe des folgenden Programms auf einem Thermocycler eine PCR durch:
   — 95 °C für 3 Minuten
   — 25 Zyklen von:
      — 95 °C für 30 Sekunden
      — 62 °C für 30 Sekunden
      — 72 °C für 60 Sekunden
   — 72 °C für 5 Minuten
   — Halten Sie die Temperatur konstant bei 10 °C

SICHERER HALTEPUNKT
Falls Sie nicht gleich mit der PCR-Reinigung fortfahren, kann die **AMP**-Platte über Nacht auf dem Thermocycler bleiben oder sie kann bei 2 °C bis 8 °C bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden.

PCR-Reinigung

Vorbereitung

1 Bringen Sie die PCR-Reinigungs-Beads auf Raumtemperatur.
2 Bereiten Sie frisches 80%iges Ethanol aus reinem Ethanol zu.

Verfahren

1 Zentrifugieren Sie die AMP-Platte eine Minute lang bei 1000 x g und 20 °C.
2 Stellen Sie eine neue MIDI-Platte (nachstehend als **CLP**-Platte bezeichnet) bereit.
3 Invertieren Sie die PCR-Reinigungs-Beads zehnmal. Mischen Sie kräftig mit dem Vortexer und invertieren Sie erneut zehnmal. Inspizieren Sie die Lösung visuell, um sicherzugehen, dass die Beads resuspendiert sind.
4 Fügen Sie 45 µl PCR-Reinigungs-Beads zu jedem Well der **CLP**-Platte hinzu.
5 Übertragen Sie das vollständige PCR-Produkt von der AMP- zur **CLP**-Platte.
6 Versiegeln Sie die **CLP**-Platte und schütteln Sie sie auf einem Mikroplattenschüttler zwei Minuten lang bei 1800 rpm.
7 Inkubieren Sie 10 Minuten lang bei Raumtemperatur, ohne zu schütteln.
8 Platzieren Sie die Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf einem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.

9 Lassen Sie die **CLP**-Platte auf dem Magnetstativ, entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.
10 Lassen Sie die **CLP**-Platte auf dem Magnetstativ und waschen Sie die Beads wie folgt:
   a Fügen Sie jedem Probe-Well 200 µl frisch zubereitetes 80%iges Ethanol hinzu.
   b Inkubieren Sie die Platte auf dem Magnetstativ mindestens 30 Sekunden bzw. so lange, bis der Überstand klar ist.
   c Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.
11 Wiederholen Sie den Waschvorgang, wie im vorherigen Schritt beschrieben.
12 Verwenden Sie eine auf 20 µl eingestellte P20-Mehrkanalpipette, um überflüssiges Ethanol zu entfernen.
13 Entfernen Sie die **CLP**-Platte vom Magnetstativ und lassen Sie die Beads 10 Minuten lang an der Luft trocknen.
14 Fügen Sie 30 µl Elutionspuffer zu jeder Probe hinzu und mischen Sie dies dann kurz mit dem Vortexer.
15 Versiegeln Sie die **CLP**-Platte und schütteln Sie sie auf einem Mikroplattenschüttler zwei Minuten lang bei 1800 rpm. Überprüfen Sie nach dem Schütteln, ob die Proben resuspendiert sind. Wiederholen Sie diesen Schritt, wenn dies nicht der Fall ist.
16 Inkubieren Sie zwei Minuten lang bei Raumtemperatur.
17 Platzieren Sie die **CLP**-Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf dem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.
18 Stellen Sie eine neue MIDI-Platte (nachstehend als **LNP**-Platte bezeichnet) bereit.
19 Übertragen Sie 20 µl des Überstands von der **CLP**-Platte auf die **LNP**-Platte.
20 [Optional] Übertragen Sie die verbleibenden 10 µl Überstand von der **CLP**-Platte auf eine neue Platte und beschriften Sie diese Platte mit einem Laufnamen und Datum. Lagern Sie diese Platte bis zum Ende des Sequenzierungslaufs und der Datenanalyse bei -25 °C bis -15 °C. Die gereinigten PCR-Produkte können im Falle von Probenfehlern zur Fehlerbehebung verwendet werden.

SICHERER HALTEPUNKT
Wenn Sie den Vorgang an diesem Punkt beenden, versiegeln Sie die **LNP**-Platte und zentrifugieren Sie sie eine Minute lang bei 1000 × g und 20 °C. Die Platte ist bis zu drei Stunden lang bei 2 °C bis 8 °C stabil.

Bibliotheksnormalisierung

Vorbereitung

1 Bereiten Sie frisches 0,1N NaOH vor.
2 Bringen Sie Bibliotheksnormalisierungsverdünner, Bibliothek-Beads und Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer auf Raumtemperatur.
3 Mischen Sie den Bibliotheksnormalisierungsverdünner kräftig mit dem Vortexer und stellen Sie sicher, dass alle Ausfällungen vollständig aufgelöst wurden.
4 Mischen Sie die Bibliothek-Beads kräftig eine Minute lang mit dem Vortexer (zeitweilig mit Inversion), bis die Beads resuspendiert sind und sich kein Pellet im unteren Bereich des Röhrchens befindet, wenn das Röhrchen invertiert wird.

Verfahren

1 Mischen Sie den Bibliotheksnormalisierungsverdünner und die Bibliothek-Beads wie folgt in einem frischen konischen 15-ml-Röhrchen:

ANMERKUNG
Wenn Sie weniger als 24 Proben verarbeiten, verwenden Sie ein frisches 1,5-ml-Röhrchen.

   a Fügen Sie für 96 Proben 4,4 ml Bibliotheksnormalisierungsverdünner hinzu.
   b Pipettieren Sie die Bibliothek-Beads zehnmal auf und ab, um zu resuspendieren.

ANMERKUNG

Es ist äußerst wichtig, das Bibliothek-Bead-Pellet im unteren Bereich des Röhrchens vollständig zu resuspendieren. Durch die Verwendung einer P1000 wird sichergestellt, dass die Beads homogen resuspendiert werden und sich keine Bead-Masse im unteren Bereich des Röhrchens befindet. Dies ist unerlässlich, um eine einheitliche Clusterdichte auf der Fließzelle zu erzielen.

c Geben Sie für 96 Proben mit einer Pipette 800 µl Bibliothek-Beads in das Röhrchen mit Bibliotheksnormalisierungsverdünner.

d Mischen Sie die Lösung, indem Sie das Röhrchen 15- bis 20-mal invertieren.

2 Geben Sie 45 µl der kombinierten Bibliotheksnormalisierungsverdünner/Bibliothek-Beads-Gebrauchslösung in jeden Well der **LNP**-Platte mit den Bibliotheken.

3 Versiegeln Sie die **LNP**-Platte und schütteln Sie sie auf einem Mikroplattenschüttler 30 Minuten lang bei 1.800 rpm.

4 Platzieren Sie die Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf einem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.

5 Lassen Sie die **LNP**-Platte auf dem Magnetstativ, entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.

6 Entfernen Sie die **LNP**-Platte vom Magnetstativ und waschen Sie die Beads mit Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer wie folgt:

a Geben Sie 45 µl Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer in jeden Probe-Well.

b Versiegeln Sie die **LNP**-Platte und schütteln Sie sie auf einem Mikroplattenschüttler fünf Minuten lang bei 1.800 rpm.

c Platzieren Sie die Platte mindestens zwei Minuten bzw. so lange auf dem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.

d Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.

7 Wiederholen Sie den Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer-Vorgang, wie im vorherigen Schritt beschrieben.

8 Verwenden Sie eine auf 20 µl eingestellte P20-Mehrkanalpipette, um überflüssige Bibliotheksnormalisierungs-Wasch-Puffer zu entfernen.

9 Entfernen Sie die **LNP**-Platte vom Magnetstativ und fügen Sie 30 µl 0,1 N NaOH zu jedem Well hinzu.

10 Versiegeln Sie die **LNP**-Platte und schütteln Sie sie auf einem Mikroplattenschüttler fünf Minuten lang bei 1.800 rpm.

11 Stellen Sie während der fünfminütigen Elution eine neue 96-Well-PCR-Platte (nachstehend als **SGP**-Platte bezeichnet) bereit.

12 Fügen Sie 30 µl Bibliothek-Lagerungspuffer zu jedem Well hinzu, der in der **SGP**-Platte verwendet werden soll.

13 Stellen Sie nach Beendigung der fünfminütigen Elution sicher, dass alle Proben in der **LNP**-Platte vollständig resuspendiert sind. Falls die Proben nicht vollständig resuspendiert sind, pipettieren Sie diese Proben behutsam auf und ab oder klopfen Sie die Platte leicht gegen den Labortisch, um die Beads zu resuspendieren, und schütteln Sie sie für weitere fünf Minuten.

14 Platzieren Sie die **LNP**-Platte mindestens zwei Minuten lang auf dem Magnetstativ.

15 Übertragen Sie den Überstand von der **LNP**- auf die **SGP**-Platte. Pipettieren Sie leicht fünfmal auf und ab, um zu mischen.

16 Verschließen Sie die **SGP**-Platte und zentrifugieren Sie sie anschließend eine Minute lang bei 1.000 × g und 20 °C.

SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie nicht gleich mit dem Bibliotheks-Pooling und der anschließenden Sequenzierung auf dem MiSeqDx fortfahren, bewahren Sie die versiegelte **SGP**-Platte bis zu 3 Tage bei -25 °C bis -15 °C auf.

Bibliotheks-Pooling

Vorbereitungen für Bibliotheks-Pooling

1 Erhitzen Sie einen für 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen passenden Hitzeblock auf 96 °C.
2 Bereiten Sie in einem Eiskübel ein Eiswasserbad vor. Kühlen Sie den Bibliothek-Verdünnungspuffer im Eiswasserbad.
3 Beginnen Sie mit dem Auftauen der MiSeqDx-Reagenzienkartusche.

Vorbereiten einer frischen Verdünnung von NaOH

ACHTUNG!
Die Verwendung von frisch verdünntem NaOH ist notwendig, um die Proben für die Clusterbildung auf dem MiSeqDx vollständig zu denaturieren.

1 Mischen Sie die folgenden Volumina in einem Mikrozentrifugenröhrchen:
   — Wasser in Laborqualität (900 µl)
   — Stock 1.0 N NaOH (100 µl)
2 Invertieren Sie das Röhrchen zum Mischen mehrmals.

Interne PhiX-Kontrolle denaturieren und verdünnen

1 Mischen Sie folgende Volumina, um die Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek auf 2 nM zu verdünnen:
   — 10 nM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek (2 µl)
   — 1X TE-Puffer (8 µl)
2 Mischen Sie folgende Volumina, um eine 1 nM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek zu erhalten:
   — 2 nM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek (10 µl)
   — 0,1 N NaOH (10 µl)
3 Mischen Sie die Lösung mit 1 nM Interne PhiX-Kontrolle kurz mit dem Vortexer.
4 Zentrifugieren Sie die Matrizenlösung eine Minute lang bei 280 x g und 20 °C.
5 Inkubieren Sie die Lösung 4,5 Minuten lang bei Raumtemperatur, um die Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek in Einzelstränge zu denaturieren.
6 Geben Sie das folgende Volumen von vorgekühltem Bibliothek-Verdünnungspuffer in das Röhrchen mit denaturierter Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek, um eine 20 pM Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek zu erhalten.
   — Denaturierte Interne PhiX-Kontrolle-Bibliothek (20 µl)
   — Vorgekühlter Bibliothek-Verdünnungspuffer (980 µl)

Vorbereiten der Reagenzienkartusche

1 Tauen Sie die MiSeqDx-Reagenzienkartusche - CF-139-Varianten-Assay in einem Wasserbad auf, das ausreichend raumtemperiertes deionisiertes Wasser enthält, um die Basis der Reagenzienkartusche bis zur auf der Reagenzienkartusche aufgedruckten Wasserlinie einzutauchen. Das Wasser darf die maximale Wasserlinie nicht übersteigen.
2 Lassen Sie die Reagenzienkartusche im raumtemperierten Wasserbad etwa eine Stunde oder so lange auftauen, bis sie vollständig aufgetaut ist.
3 Nehmen Sie die Kartusche aus dem Wasserbad und klopfen Sie sie vorsichtig auf dem Tisch ab, um das Wasser von der Basis der Kartusche zu entfernen. Trocknen Sie die Basis der Kartusche ab. Stellen Sie sicher, dass kein Wasser auf die Oberseite der Reagenzienkartusche gespritzt ist.

Überprüfen der Reagenzienkartusche

1 Invertieren Sie die Reagenzienkartusche zehnmal, um die aufgetauten Reagenzien zu mischen, und überprüfen Sie anschließend visuell, ob alle Positionen aufgetaut sind.

HINWEIS
Es ist äußerst wichtig, dass die Reagenzien in der Kartusche vollständig aufgetaut und gemischt sind, damit eine ordnungsgemäße Sequenzierung sichergestellt werden kann.

2 Überprüfen Sie visuell das Reagenz in Position 1, um sicherzustellen, dass es vollständig gemischt ist und keine Ausfällungen enthält.
3 Klopfen Sie die Kartusche vorsichtig auf dem Tisch ab, um Luftblasen in den Reagenzien zu entfernen.

ANMERKUNG
Die MiSeqDx-Sipper-Röhrchen reichen bis zum Boden der einzelnen Behälter, um die Reagenzien zu aspirieren. Deshalb ist es wichtig, dass sich keine Luftblasen in den Behältern befinden.

4 Lagern Sie die Reagenzienkartusche auf Eis bzw. lagern Sie sie bei 2 °C bis 8 °C (bis zu sechs Stunden), bis Sie den Lauf konfigurieren können. Die besten Ergebnisse erzielen Sie, wenn Sie direkt mit dem Laden der Probe und dem Konfigurieren des Laufs fortfahren.

Vorbereiten von Proben für die Sequenzierung

1 Bringen Sie den Bibliothek-Verdünnungspuffer auf Raumtemperatur. Mischen Sie den Bibliothek-Verdünnungspuffer kräftig mit dem Vortexer und stellen Sie sicher, dass alle Ausfällungen vollständig aufgelöst wurden.
2 Wenn die **SGP**-Platte gefroren gelagert wurde, tauen Sie die **SGP**-Platte bei Raumtemperatur auf.
3 Zentrifugieren Sie die **SGP**-Platte eine Minute lang bei 1000 x g und 20 °C.
4 Stellen Sie ein neues Eppendorf-Gefäß (nachfolgend als **PAL**-Röhrchen bezeichnet) bereit.
5 Suchen Sie die Proben aus, die für die Sequenzierung zu einem Pool zusammengefasst werden sollen. Es können maximal 48 Proben für die Sequenzierung zu einem Pool zusammengefasst werden.
6 Wenn die **SGP**-Platte gefroren gelagert wurde, mischen Sie jede zu sequenzierende Bibliothek, indem Sie drei- bis fünfmal auf- und abpipettieren.
7 Übertragen Sie 5 µl von jeder zu sequenzierenden Bibliothek von der **SGP**-Platte Spalte für Spalte auf einen PCR-8-fach-Röhrchenstreifen. Verschließen Sie die **SGP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung und legen Sie sie beiseite.

HINWEIS
Bewahren Sie die versiegelte **SGP**-Platte bei -25 °C bis -15 °C auf. Die versiegelte **SGP**-Platte kann maximal 3 Tage lang aufbewahrt werden.

8 Kombinieren und übertragen Sie den Inhalt des PCR-8-fach-Röhrchenstreifens in das **PAL**-Röhrchen. Schütteln Sie das **PAL**-Röhrchen gründlich.
9 Stellen Sie ein neues Eppendorf-Gefäß (nachfolgend als **DAL**-Röhrchen bezeichnet) bereit.
10 Geben Sie 585 µl Bibliothek-Verdünnungspuffer in das **DAL**-Röhrchen.
11 Geben Sie 6 µl von 20 pM Interne PhiX-Kontrolle in das **DAL**-Röhrchen. Pipettieren Sie drei- bis fünfmal auf und ab, um die Spitze zu spülen und eine vollständige Übertragung sicherzustellen.
12 Übertragen Sie 9 µl **PAL** in das **DAL**-Röhrchen, das Bibliothek-Verdünnungspuffer enthält. Pipettieren Sie drei- bis fünfmal auf und ab, um die Spitze zu spülen und eine vollständige Übertragung sicherzustellen.
13 Mischen Sie das **DAL**-Röhrchen mit dem Vortexer bei höchster Geschwindigkeit.
14 Zentrifugieren Sie das **DAL**-Röhrchen eine Minute lang bei 1000 x g und 20 °C.
15 Inkubieren Sie das **DAL**-Röhrchen bei 96 °C zwei Minuten lang auf einem Hitzeblock.
16 Invertieren Sie das **DAL**-Röhrchen nach der Inkubation ein- bis zweimal, um es gut zu mischen, und legen Sie es dann sofort in das Eiswasserbad.
17 Belassen Sie das **DAL**-Röhrchen fünf Minuten lang im Eiswasserbad.

Laden der Probenbibliotheken in eine Kartusche

1 Verwenden Sie eine separate, saubere und leere 1-ml-Pipettenspitze, um die Verschlussfolie über dem mit **Load Samples** (Proben laden) auf der Reagenzienkartusche bezeichneten Behälter zu durchstechen.

2 Geben Sie mit der Pipette 600 µl der Probenbibliotheken in den Behälter **Load Samples** (Proben laden). Achten Sie beim Zuführen der Probe darauf, die Verschlussfolie nicht zu berühren.
Überprüfen Sie nach dem Laden der Probe, ob sich Luftblasen im Behälter befinden. Falls Luftblasen vorhanden sind, klopfen Sie die Kartusche vorsichtig auf den Tisch, damit die Blasen entweichen.
3 Fahren Sie mit den Schritten zum Einrichten des Laufs unter Verwendung der MiSeq Operating Software (MOS)-Benutzeroberfläche fort.

Interpretation der Ergebnisse

1 Der Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose dient dem Nachweis von 139 CFTR-Varianten, darunter den vom ACMG empfohlenen Varianten (Tabelle 2).
2 Der Assay-Bericht listet die Probennamen und den Genotyp für jede in einer Probe nachgewiesene Variante auf.
   - Alle Proben werden auf 134 CF-verursachende Varianten und die vom ACMG empfohlene R117H-Variante untersucht. Nur nachgewiesene Mutantenallele werden im Assay-Bericht aufgeführt.
   - Die PolyTG/PolyT-Variante wird nur gemeldet, wenn die R117H-Variante in einer Probe identifiziert wird. Bei Patienten mit einer R117H-Variante sollten weitere Tests durchgeführt werden, um festzustellen, ob sich eine PolyTG/PolyT-Variante, die den klinischen Phänotyp [z. B. 12-13 (TG) oder 5T] beeinflussen kann, in cis/trans-Ausrichtung zur R117H-Variante befindet.

     HINWEIS
     Der PolyTG/PolyT-Genotyp wird vom MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose auf Basis der Readanzahl der häufigsten Genotypen bestimmt. Aufgrund der digitalen Natur der Sequenzierung der nächsten Generation ist der Assay im Vergleich zu anderen sequenzierungsbasierten Technologien, die nur wenige Beobachtungen verwenden, in der Lage, eine hohe Genauigkeit aus vielen Beobachtungen zu erzielen.

   - Wenn eine Probe bei Entdeckung eines oder mehrerer der gutartigen Polymorphismen I506V, I507V und F508C den homozygoten F508del- oder I507del-Genotyp aufweist, wird dies für die Probe gemeldet. Wenn es sich bei allen drei gutartigen Polymorphismen um den Wildtyp handelt, gibt der Bericht an, dass in der Probe keine I506V-, I507V- und F508C-Varianten vorhanden sind.

     HINWEIS
     Da dies ein sequenzierungsbasierter Assay ist, wird die F508del- oder I507del-Meldung aufgrund der drei gutartigen Polymorphismen nicht beeinträchtigt. Daher werden keine Korrekturen am Nachweisergebnis vorgenommen.

   - Das Genotypergebnis wird als HET gemeldet, wenn eine Probe als heterozygot identifiziert wird und sowohl Wildtyp- als auch Mutantenallele in der Probe nachgewiesen werden.
   - Das Genotypergebnis wird als HOM gemeldet, wenn eine Probe als homozygot identifiziert wird und nur das Mutantenallel in der Probe nachgewiesen wird.
   - Wenn keine Variante in einer Probe identifiziert wird, gibt der Bericht „No panel variants are detected“ (Keine Panel-Varianten nachgewiesen) an.
3 Der Assay-Bericht enthält Informationen zur Proben-Call-Rate für jede Probe. Die Call-Rate wird berechnet als die Anzahl der Variantenpositionen/-regionen, die einen vordefinierten Konfidenzschwellenwert erreichen, geteilt durch die Gesamtzahl der untersuchten Positionen/Regionen.
   - Bei Proben, die bedingte Meldungen erfordern, werden die zusätzlich untersuchten Varianten in der Call-Raten-Berechnung berücksichtigt.
   - Jede Variante mit einem vordefinierten Konfidenzwert unter dem Schwellenwert wird als „No Call“ gemeldet. Es wird empfohlen, die Probe zu wiederholen.
4 Ein Probenergebnis wird nur dann als gültig betrachtet, wenn die Call-Rate mindestens 99 % beträgt. Wenn die Call-Rate unter 99 % beträgt, wird die Leistung als „Fail“ (Fehlgeschlagen) angegeben und die Probe muss wiederholt werden.

HINWEIS: Wenn die Proben-Call-Rate weniger als 50 % beträgt, wird die Leistung als „Fail“ (Fehlgeschlagen) angegeben und mit der Anmerkung „Sample Failed“ (Probe fehlgeschlagen) im Bericht versehen. Es werden keine Varianteninformationen angezeigt. Diese Probe muss wiederholt werden.

5 Es wird empfohlen, dass anhand von synthetischen Proben validierte Varianten (siehe Genauigkeitstabelle) vom Benutzer mithilfe einer validierten Referenzmethode verifiziert werden, bevor ein Bericht über das erste Patientenergebnis mit diesen Varianten erstellt wird.

6 Wenn mehr als zwei Varianten in einer Probe identifiziert werden, sollte der Benutzer das Ergebnis verifizieren, indem er die Probe unter Verwendung des Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose mit einem frischen gDNA-Extrakt wiederholt, um eine Kreuzkontamination der Probe auszuschließen.

HINWEIS: Es sollte eine Haplotyp-Phasierung in Betracht gezogen werden, wenn zwei oder mehr Varianten nachgewiesen werden.

7 Alle Varianteninterpretationen sollten von einem zertifizierten klinischen Molekulargenetiker oder einem äquivalenten Spezialisten gemäß lokalen Verfahren und Richtlinien durchgeführt werden[15]. Zu den potenziellen Interpretationsreferenzen gehören unter anderem: CFTR2-Datenbank[11], Sosnay-Papier[13], ACMG-Richtlinien von 2004[1] und die Committee Opinion des ACOG von 2011[2].

Informationen zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse bzw. zur Beschreibung des Inhalts in einem Bericht im Textdateiformat finden Sie im *MiSeq Reporter – Benutzerhandbuch (Teile-Nr. 15038356)*.

Verfahren zur Qualitätskontrolle

Die guten Laborpraktiken schreiben vor, dass Kontrollproben evaluiert werden müssen, um Unterschiede bei der Blutverarbeitung und bei technischen Verfahren im Labor des Benutzers zu erkennen, die zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen können.

1 **Positive Kontrollproben** – Eine positive DNA-Kontrollprobe ist bei jedem Lauf erforderlich. Die positive DNA-Kontrollprobe sollte eine gut charakterisierte Probe mit mindestens einer bekannten CFTR-Variante sein.[16] Illumina empfiehlt die Verwendung rotierender positiver Kontrollproben, die den technischen Standards und Richtlinien des ACMG von 2008 für CF-Mutationstests[17] und den klinischen Laborstandards für die Sequenzierung der nächsten Generation des ACMG aus dem Jahr 2013 entsprechen.[18] Die positive Kontrollprobe muss den erwarteten Genotyp generieren. Wenn die positive Kontrollprobe einen anderen als den erwarteten Genotyp generiert, ist möglicherweise ein Fehler bei der Probenverfolgung oder eine fehlerhafte Aufzeichnung von Index-Primern aufgetreten. Der gesamte Assay muss wiederholt werden, angefangen bei der Bibliotheksvorbereitung.

2 **Negative Kontrollprobe (Keine Matrize/Keine DNA)** – Die Verwendung einer negativen Kontrollprobe (keine Matrize/keine DNA) ist bei jedem Lauf erforderlich, um mögliche Kontaminationsvorkommnisse zu entdecken. Die Call-Rate sollte bei der negativen Kontrollprobe weniger als 10 % betragen. Wenn eine negative Kontrollprobe eine Call-Rate von mehr als 10 % generiert, ist während der Assay-Verarbeitung möglicherweise eine Kontamination aufgetreten. Der Assay wird als fehlgeschlagen angesehen und der gesamte Assay muss wiederholt werden, angefangen bei der Bibliotheksvorbereitung.

3 **Wildtyp-Kontrollprobe** – Die Wildtyp-DNA-Kontrollprobe wird bei jedem Lauf empfohlen. Die Wildtyp-Kontrollprobe muss eine gut charakterisierte Probe sein, die keine CFTR-Varianten enthält. Die Wildtyp-Kontrollprobe muss den erwarteten Genotyp generieren. Wenn die Wildtyp-Kontrollprobe einen anderen als den erwarteten Genotyp generiert, ist möglicherweise ein Fehler bei der Probenverfolgung oder eine fehlerhafte Aufzeichnung von Index-Primern aufgetreten. Der gesamte Assay muss wiederholt werden, angefangen bei der Bibliotheksvorbereitung.

4 Vor der anfänglichen Verwendung dieses Produkts im Labor des Benutzers sollte die Leistung des Assays durch das Testen mehrerer positiver und negativer Kontrollproben mit bekannten Leistungsmerkmalen verifiziert werden.

5 Alle Qualitätskontrollen sollten in Übereinstimmung mit den lokalen, bundes- und/oder landesweiten Vorschriften oder Zulassungsanforderungen durchgeführt werden.

Leistungsmerkmale

Genauigkeit

Die Genauigkeit des Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose ergab sich aus der Auswertung von 500 Proben, die eine Vielzahl von CFTR-Varianten aus vier verschiedenen Quellen repräsentieren. Die primäre Quelle der Genauigkeitsdaten war eine klinische Genauigkeitsstudie, die mit einem Panel aus 366 Proben durchgeführt wurde. Die Mehrzahl (n = 355) der Proben bestand aus archivierten, anonymisierten klinischen gDNA-Proben, die aus menschlichem Blut isoliert wurden. Die restlichen 11 Proben wurden aus im Handel erhältlichen Zelllinienproben gewonnen.

Die Daten dieser Studie wurden durch Genauigkeitsdaten von 68 Zelllinienproben, die in der Reproduzierbarkeitsstudie untersucht wurden, 14 klinischen Proben aus der analytischen Studie zur Auswertung der Extraktionsmethode sowie 52 synthetischen Plasmidproben ergänzt. Die synthetischen Plasmide wurden so konstruiert, dass sie den genomischen Kontext der seltenen Varianten enthielten, und umfassten eine bis neun Varianten innerhalb desselben Konstrukts. Sie wurden linearisiert, auf der genomischen DNA mit entsprechenden Kopienzahlen verdünnt und mit menschlichen genomischen DNA-Proben des Wildtyp-Genotyps bei äquivalenten Kopienzahlen gemischt, um eine heterozygote Probe zu imitieren.

Die Genotypisierungsergebnisse für 137 SNV-/kleine InDel-Stellen einschließlich der PolyTG/PolyT-Region wurden mit der bidirektionalen Sanger-Sequenzanalyse verglichen. Zwei validierte PCR-basierte Assays wurden als Referenzmethode für die beiden großen Deletionen im Panel verwendet. Jeder doppelte PCR-Assay nutzte zwei Primer-Sätze, um zwischen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Genotypen zu unterscheiden. Einer der Primer-Sätze diente dazu, die Deletionshaltepunkte zu flankieren, während der andere Satz eine in der Deletion befindliche Region amplifizierte. Die zwei Produkte wurden anhand von Größentrennung auf einem Agarosegel nachgewiesen.

Die PCR-Assays wurden anhand eines Panels aus insgesamt 28 Proben (22 Proben für jede Deletion) validiert, die aus aus Zelllinien und Blut gewonnenen genomischen DNA-Proben sowie synthetischen Plasmiden bestanden, die den WT-, HET- und HOM-Genotyp für jede große Deletion umfassten. Anhand der Untersuchung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel wurde bestätigt, dass die PCR-Assays eine 100%ige Spezifität und Reproduzierbarkeit für alle getesteten Proben aufwiesen. Die Genauigkeit der PCR-Assays wurde anhand der Sanger-Sequenzierung bestätigt und für 100 % aller Proben nachgewiesen.

Für jeden Genotyp wurde die Genauigkeit anhand von drei statistischen Messgrößen ermittelt. Die positive Übereinstimmung wurde für jede Genotyp-Variante berechnet, indem die Anzahl der Proben mit übereinstimmenden Varianten-Calls durch die Gesamtzahl der Proben mit dieser Variante, wie anhand der Referenzmethoden ermittelt, dividiert wurde. Die negative Übereinstimmung wurde über alle Wildtyp-Positionen (WT-Positionen) hinweg berechnet, indem die Anzahl der konkordanten WT-Positionen durch die Gesamtzahl der WT-Positionen, wie in den Referenzmethoden ermittelt, dividiert wurde. Die allgemeine Übereinstimmung (Overall Agreement, OA) wurde über alle gemeldeten Positionen hinweg berechnet, indem die Anzahl der konkordanten WT- und Varianten-Positionen durch die Gesamtzahl der gemeldeten Positionen, wie in den Referenzmethoden ermittelt, dividiert wurde.

Der Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose hatte einen PA-Genotypgrad von 100 %. Der NA-Wert für alle WT-Positionen war > 99,99 % und der OA-Wert für alle gemeldeten Positionen war ebenfalls > 99,99 %. Alle Testergebnisse basieren auf anfänglichen Tests.

Tabelle 15 Gesamtgenauigkeit des MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Über-ein-stimmung (%)	Negative Über-ein-stimmung (%)	Gesamt-über-ein stimmung (%)
				Klini-sche Proben	Zelllinien-proben	Synthe-tische Proben						
CFTR dele2, 3	DEL	c.54-5940_ 273+10250 del21kb	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
E60X	SNV	c.178G >T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
P67L	SNV	c.200C >T	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R75X	SNV	c.223C >T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G85E	SNV	c.254G >A	500	6	2	0	492	0	0	100	100	100
394delTT	DIV	c.262_263 delTT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
406-1G>A	SNV	c.274-1G >A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
E92X	SNV	c.274G >A	500	0	1	1	498	0	0	100	100	100
D110H	SNV	c.328G >C	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
R117C	SNV	c.349C >T	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
R117H	SNV	c.350G >A	500	17	2	0	481	0	0	100	100	100
Y122X	SNV	c.366T>A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
621+1G>T	SNV	c.489+1G >T	500	7	5	0	488	0	0	100	100	100
663delT	DIV	c.531delT	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben						
G178R	SNV	c.532G >A	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
711+1G>T	SNV	c.579+1G >T	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
P205S*	SNV	c.613C >T	500	1	0	1	498	0	0	100*	100	100
L206W	SNV	c.617T >G	500	8	1	0	491	0	0	100	100	100
1078delT	DIV	c.948delT	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
G330X	SNV	c.988G >T	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R334W	SNV	c.1000C >T	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
I336K	SNV	c.1007T >A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
1154insTC	DIV	c.1022_1023 insTC	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R347H	SNV	c.1040G >A	500	6	1	1	492	0	0	100	100	100
R347P	SNV	c.1040G>C	500	3	2	0	495	0	0	100	100	100
R352Q	SNV	c.1055G >A	500	5	0	0	495	0	0	100	100	100
A455E	SNV	c.1364C >A	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
S466X(C>G)	SNV	c.1397C >G	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
1548delG	DIV	c.1418delG	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
Q493X	SNV	c.1477C >T	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Überein-stimmung (%)	Negative Überein-stimmung (%)	Gesamt-überein stimmung (%)
				Klini-sche Proben	Zelllinien-proben	Synthe-tische Proben						
I507del	DIV	c.1519_1521 delATC	500	4	2	0	494	0	0	100	100	100
F508del	DIV	c.1521_1523 delCTT	500	84	29	0	387	0	0	100	100	100
1677delTA	DIV	c.1545_1546 delTA	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
V520F	SNV	c.1558G >T	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
1717-1G>A	SNV	c.1585-1G >A	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
G542X	SNV	c.1624G>T	500	12	3	0	485	0	0	100	100	100
S549N	SNV	c.1646G >A	500	2	2	1	495	0	0	100	100	100
S549R (c.1647T>G)	SNV	c.1647T >G	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
G551D	SNV	c.1652G>A	500	8	3	0	489	0	0	100	100	100
R553X	SNV	c.1657C>T	500	8	2	0	490	0	0	100	100	100
A559T	SNV	c.1675G >A	500	4	0	1	495	0	0	100	100	100
R560T	SNV	c.1679G>C	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
1812-1 G>A	SNV	c.1680-1G >A	500	0	2	0	498	0	0	100	100	100

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Überein-stimmung (%)	Negative Überein-stimmung (%)	Gesamt-überein stimmung (%)
				Klini-sche Proben	Zelllinien-proben	Synthe-tische Proben						
1898+1G>A	SNV	c.1766+1G >A	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2143delT	DIV	c.2012delT	500	2	1	0	497	0	0	100	100	100
2183AA>G	DIV	c.2051_ 2052del AAinsG	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
2184insA	DIV	c.2052_2 053insA	500	3	0	1	496	0	0	100	100	100
2184delA	DIV	c.2052delA	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100
R709X	SNV	c.2125C >T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
K710X	SNV	c.2128A >T	500	3	0	0	497	0	0	100	100	100
2307insA	DIV	c.2175_21 76insA	500	3	0	2	495	0	0	100	100	100
R764X	SNV	c.2290C >T	500	1	0	2	497	0	0	100	100	100
W846X	SNV	c.2537G >A	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
2789+5G>A	SNV	c.2657+5G >A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
Q890X	SNV	c.2668C >T	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3120G>A	SNV	c.2988G >A	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Überein-stimmung (%)	Negative Überein-stimmung (%)	Gesamt-überein stimmung (%)
				Klini-sche Proben	Zelllinien-proben	Synthe-tische Proben						
3120+1G>A	SNV	c.2988+1G >A	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
3272-26A>G	SNV	c.3140-2 6A>G	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
R1066C	SNV	c.3196C >T	500	6	0	0	494	0	0	100	100	100
R1066H	SNV	c.3197G >A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100
W1089X	SNV	c.3266G >A	500	4	0	0	496	0	0	100	100	100
Y1092X(C>A)	SNV	c.3276C >A	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
M1101K	SNV	c.3302T>A	500	2	2	0	496	0	0	100	100	100
R1158X	SNV	c.3472C>T	500	7	1	0	492	0	0	100	100	100
R1162X	SNV	c.3484C >T	500	5	1	0	494	0	0	100	100	100
3659delC	DIV	c.3528delC	500	4	1	0	495	0	0	100	100	100
S1196X	SNV	c.3587C >G	500	1	0	0	499	0	0	100	100	100
3791delC	DIV	c.3659delC	500	2	0	0	498	0	0	100	100	100
3849+10kbC>T	SNV	c.3717+12 191C>T	500	11	2	0	487	0	0	100	100	100
3876delA	DIV	c.3744delA	500	6	1	0	493	0	0	100	100	100
S1251N	SNV	c.3752G >A	500	1	0	1	498	0	0	100	100	100

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Überein-stimmung (%)	Negative Überein-stimmung (%)	Gesamt-überein stimmung (%)
				Klini-sche Proben	Zelllinien-proben	Synthe-tische Proben						
3905insT	DIV	c.3773_3774insT	500	3	1	0	496	0	0	100	100	100
W1282X	SNV	c.3846G >A	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
N1303K	SNV	c.3909C >G	500	9	1	0	490	0	0	100	100	100
CFTR dele22,23[§]	DEL	c.3964-78_4242+577del	500	1	0	1	498	1[§]	0	100	99,80	99,80
M1V	SNV	c.1A >G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q39X	SNV	c.115C >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
405+1 G>A	SNV	c.273+1G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E92K	SNV	c.274G >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q98X	SNV	c.292C >T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
457TAT>G	DIV	c.325_327delTATinsG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
574delA	DIV	c.442delA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
711+3A>G	SNV	c.579+3A >G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
711+5 G>A	SNV	c.579+5G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
				Klinische Proben	Zelllinienproben	Synthetische Proben						
712-1 G>T	SNV	c.580-1G >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
H199Y	SNV	c.595C >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q220X	SNV	c.658C >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
852del22	DIV	c.720741 delAGGG AGAAT GATGAT GAAGTAC	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
T338I	SNV	c.1013C >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S341P	SNV	c.1021T >C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1213delT	DIV	c.1081delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1248+1G>A	SNV	c.1116+1G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1259insA	DIV	c.1127_1 128insA	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
W401X (c.1202G>A)	SNV	c.1202G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W401X (c.1203G>A)	SNV	c.1203G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1341+1G>A	SNV	c.1209+1G >A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Überein-stimmung (%)	Negative Überein-stimmung (%)	Gesamt-überein stimmung (%)
				Klini-sche Proben	Zelllinien-proben	Synthe-tische Proben						
1461ins4	DIV	c.1329_ 1330ins AGAT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1525-1G>A	SNV	c.1393-1G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S466X(C>A)	SNV	c.1397C >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L467P	SNV	c.1400T >C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S489X	SNV	1466C>A	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
S492F	SNV	c.1475C >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q525X	SNV	c.1573C >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1717-8G>A	SNV	c.1585-8G>A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S549R (c.1645A>C)	SNV	c.1645A >C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q552X	SNV	c.1654C >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R560K	SNV	c.1679G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
1811+1.6kb A>G	SNV	c.1679+1.6 kbA>G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E585X	SNV	c.1753G >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Überein-stimmung (%)	Negative Überein-stimmung (%)	Gesamt-überein stimmung (%)
				Klini-sche Proben	Zelllinien-proben	Synthe-tische Proben						
1898+3A>G	SNV	c.1766+3A >G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L732X	SNV	c.2195T >G	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2347delG	DIV	c.2215delG	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2585delT	DIV	c.2453delT	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E822X	SNV	c.2464G >T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
2622+1G>A	SNV	c.2490+1G >T	500	0	0	2	498	0	0	100	100	100
E831X	SNV	c.2491G >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
R851X	SNV	c.2551C >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
2711delT	DIV	c.2583delT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L927P	SNV	c.2780T >C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
S945L	SNV	c.2834C >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3007delG	DIV	c.2875delG	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G970R	SNV	c.2908G >C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
3121-1G>A	SNV	c.2989-1G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
L1065P	SNV	c.3194T >C	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Überein-stimmung (%)	Negative Überein-stimmung (%)	Gesamt-überein stimmung (%)
				Klini-sche Proben	Zelllinien-proben	Synthe-tische Proben						
L1077P^	SNV	c.3230T >C	500	0	0	1	499	0^	0	100	100	100
Y1092X(C>G)	SNV	c.3276C >G	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
E1104X	SNV	c.3310G >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3611G>A)	SNV	c.3611G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
W1204X (c.3612G>A)	SNV	c.3612G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
G1244E	SNV	c.3731G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4005+1G>A	SNV	c.3873+1G >A	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4016insT	DIV	c.3884_3 885insT	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
Q1313X	SNV	c.3937C >T	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4209TG TT>AA	DIV	c.4077_ 4080delT GTTinsAA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
4382delA	DIV	c.4251delA	500	0	0	1	499	0	0	100	100	100
PolyTG/ PolyT€	PolyTGPolyT	c.1210-12T [5_9]	19	17	2	0	0	0	0	100	N/A	100

Variante (allgemeiner Name)	Varianten-typ	cDNA-Name	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Überein-stimmung (%)	Negative Überein-stimmung (%)	Gesamt-überein stimmung (%)
				Klini-sche Proben	Zelllinien-proben	Synthe-tische Proben						
I506V¥	SNV	c.1516A >G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
I507V¥	SNV	c.1519A>G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
F508C¥	SNV	c.1523T >G	1	0	0	0	1	0	0	N/A	100	100
Summe			67522	557			66965	1	0	100	> 99,99	> 99,99

DIV ist ein Akronym für Deletions-/Insertions-Variante.
* Im Sanger-Bericht wurde die P205S-Variante für die klinische Probe als heterozygot gemeldet. Eine Prüfung der Sanger-Daten zeigte jedoch, dass die Variante homozygot war und falsch gemeldet wurde. Das MiSeqDx-System meldete die Variante als homozygot.
§ Eine synthetische, für Exon8 heterozygote Probe wurde für die Variante CFTR dele22, 23 als heterozygot gemeldet. Weitere Untersuchungen ergaben, dass dieses Ergebnis wahrscheinlich von einer geringfügigen Kontamination herrührte.
^ Bei der ursprünglichen synthetischen heterozygoten Probe wurde festgestellt, dass diese nicht korrekt vorbereitet wurde. Als sie nach der erneuten Vorbereitung mit demselben Plasmid getestet wurde, wurde sie nachgewiesen.
€ Wenn R117H positiv ist, wird die PolyTG/PolyT-Variante zusätzlich gemeldet.
¥ Im Fall einer homozygoten F508del-Variante wurden drei weitere Wildtyp-Basen (d. h. die Varianten I506V, I507V, F508C), die in der Probe nicht identifiziert wurden, zusätzlich gemeldet.

Tabelle 16 Genauigkeit des MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose für I506V, I507V und F508C.

Variante (allgemeiner Name)	Summe Calls pro Vari-ante	Positive Calls (Varianten)			Negative Calls (Wildtyp)	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstim-mung (%)	Negative Übereinstim-mung (%)	Gesamt-überein stimmung (%)
		Klini-sche Proben	Zelllinien-proben	Synthe-tische Proben						
I506V	500	7	0	0	493	0	0	100	100	100
I507V	500	0	1	0	499	0	0	100	100	100
F508C	500	1	1	0	498	0	0	100	100	100

Tabelle 17 Genauigkeit des MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose für PolyTG/PolyT-Varianten

PolyTGPolyT-Genotyp	Anzahl der klinischen Proben	Anzahl der Zelllinienproben	Anzahl der synthetischen Proben	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“*	% Genauigkeit
(TG)9(T)7/(TG)11(T)7	2	0	0	0	1	50
(TG)9(T)9/(TG)10(T)7	1	0	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)7	5	1	0	0	0	100
(TG)9(T)9/(TG)11(T)9	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)7	25	8	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)10(T)9	39	16	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)11(T)7	72	11	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)5	1	0	0	0	0	100
(TG)10(T)7/(TG)12(T)7	10	1	0	0	1	90,9
(TG)10(T)9/(TG)10(T)9	7	6	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)5	5	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)7	76	20	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)11(T)9	3	0	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	3	2	0	0	0	100
(TG)10(T)9/(TG)12(T)7	13	0	0	0	1	92,3
(TG)11(T)5/(TG)11(T)7	6	0	0	1	0	83,3
(TG)11(T)7/(TG)11(T)7	52	8	0	0	0	100

PolyTGPolyT-Genotyp	Anzahl der klinischen Proben	Anzahl der Zelllinienproben	Anzahl der synthetischen Proben	Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“*	% Genauigkeit
(TG)11(T)7/(TG)11(T)9^	2	1	0	3^	0	0
(TG)11(T)7/(TG)12(T)5	2	0	0	0	0	100
(TG)11(T)7/(TG)12(T)7	37	3	0	0	0	100
(TG)11(T)9/(TG)12(T)7	3	0	0	0	0	100
(TG)12(T)7/(TG)12(T)7	2	2	0	0	0	100
Summe**	448			4	3	98,44

* Proben wurden nicht erneut getestet.

^ Eines der diskordanten Ergebnisse stammte aus der Reproduzierbarkeitsstudie. Das PolyTG/PolyT-Ergebnis der Probe war bei allen 18 Replikaten konkordant, bei der bidirektionalen Sanger-Sequenzierung jedoch diskordant.

** Die Gesamtprobenanzahl für die PolyTG/PolyT-Variante beträgt 448, da alle synthetischen Proben (n = 52) durch Mischen linearisierter Plasmide mit einer von zwei Zelllinienproben, die Teil der Reproduzierbarkeitsstudie waren, erzeugt wurden. Da die Meldung der PolyTG/PolyT-Variante für diese zusätzlichen synthetischen Proben zu einer übermäßigen Meldung der Variante führen würde, wurden die synthetischen Proben von dieser Analyse ausgeschlossen.

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des MiSeqDx-Systems für zystische Fibrose wurde anhand einer Blindstudie an drei Teststandorten und mit zwei Bedienern an jedem Standort ermittelt. Zwei gut charakterisierte Panels mit jeweils 46 Proben wurden an jedem Standort von beiden Bedienern getestet. Daraus ergaben sich 810 Calls pro Standort. Die Panels enthielten eine Mischung aus genomischer DNA aus lymphoblastoiden Zelllinien mit bekannten Varianten im *CFTR*-Gen sowie einige leukozytenbereinigte Blutproben, die mit lymphoblastoiden Zelllinien bekannter Varianten im *CFTR*-Gen versetzt wurden. Die Blutproben wurden bereitgestellt, um die Inkorporation der Extraktionsschritte zum Vorbereiten der gDNA zu ermöglichen, die als primäre Zugabe für den Assay-Workflow dient.

Die Proben-First-Pass-Rate, definiert als die Anzahl der Proben, die beim ersten Versuch den QC-Kennzahlen entsprechen, betrug 99,9 %.

Die positive Übereinstimmung auf Genotypebene betrug bei allen Varianten 99,77 %. Die negative Übereinstimmung für alle WT-Positionen betrug 99,88 % und die allgemeine Übereinstimmung für alle gemeldeten Positionen betrug ebenfalls 99,88 %. Alle Testergebnisse basieren auf anfänglichen Tests. Für diese Reproduzierbarkeitsstudie wurden keine Wiederholungstests durchgeführt.

Tabelle 18 Reproduzierbarkeit des MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Summe Calls pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
A	1	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	2	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4*	F508del/ 2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1*	100	100	100
A	5^	Y122X/ R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135^	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/ 2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Summe Calls pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	9**	F508del/ W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	10**	F508del/ 3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2**	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/ 3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/ 3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Summe Calls pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C nicht vorhanden	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/ 3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/ F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/ 711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/ 621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/ R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/ Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Summe Calls pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/ R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/ G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Summe Calls pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
A	39	F508del/ 3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/ 3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/ 3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/ F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/ 621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/ R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Summe Calls pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
B	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	49	F508del/ 1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	51	F508del/ 2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	52	3876delA (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	53	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	54	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Summe Calls pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
B	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	65	1078delT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	66	G178R/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	71	E92X/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	72§	621+1G>T/ 1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1§	100	99,96	99,96

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Summe Calls pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
B	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	75^	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135^	94,44	94,44	94,44
B	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	77	621+1G>T/ A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	78	1812-1 G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	80	F508del/ R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	81	F508del/ G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	82	R347P/ F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	83	R117H/ F508del (HET)	(TG)10(T)9/ (TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
B	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Panel	Proben-Nr.	Proben-Genotyp	Varianten	Summe Calls pro Standort	Positiv übereinstimmende Calls (Varianten)			Negativ übereinstimmende Calls (Wildtyp)			Anzahl der Miscalls	Anzahl der „No Calls“	Positive Übereinstimmung (%)	Negative Übereinstimmung (%)	Gesamtübereinstimmung (%)
					Standort 1	Standort 2	Standort 3	Standort 1	Standort 2	Standort 3					
B	86§	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1§	100	99,96	99,96
B	87	F508del/ 1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	N/A	100	100
B	89	F508del/ 2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
B	90	3905insT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	91	394delTT (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
B	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Summe				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

* Die Position des Wildtyps, entsprechend der N1303K-Variante für ein Replikat, das aufgrund unzureichender Abdeckung zu einem No-Call führte.
^ Ein Replikat der Proben 5 und 75 hatte eine Call-Rate von 0 %. Die weitere Untersuchung deutet darauf hin, dass vor der Bibliotheksvorbereitung möglicherweise keine Proben zur Probenplatte hinzugefügt wurden, da die in den Röhrchen verbleibenden Probenvolumina konsistent waren und nichts von der Füllmenge entfernt wurde.
** Es gibt Hinweise darauf, dass die Proben 9 und 10 vor der Bibliotheksvorbereitung wahrscheinlich vom Bediener vertauscht wurden.
§ Die Position des Wildtyps, entsprechend der M1V-Variante für ein Replikat von jeder der beiden Proben, das aufgrund unzureichender Abdeckung zu einem No-Call führte.

Tabelle 19 Ergänzende Informationen zu Varianten aus Reproduzierbarkeitsstudien

Variation (allgemeiner Name)	Variantentyp	CFTR-Genregion
PolyTG/PolyT	Zusammengesetzte DIV*	Intron 9
2183AA>G	Zusammengesetzte DIV*	Exon 14
CFTR dele2, 3	DEL	Intron1-Intron3
1154insTC	DIV*	Exon 8
I507del	DIV*	Exon 11
F508del	DIV*	Exon 11
2143delT	DIV*	Exon 14
3659delC	DIV*	Exon 22
3876delA	DIV*	Exon 23
394delTT	DIV in Homopolymer-Region*	Exon 3
1078delT	DIV in Homopolymer-Region*	Exon 8
2184delA	DIV in Homopolymer-Region*	Exon 14
3905insT	DIV in Homopolymer-Region*	Exon 23
E60X	SNV	Exon 3
R75X	SNV	Exon 3
G85E	SNV	Exon 3
E92X	SNV	Exon 4
R117H	SNV	Exon 4
Y122X	SNV	Exon 4
621+1G>T	SNV	Intron 4
G178R	SNV	Exon 5
711+1G>T	SNV	Intron 5
L206W	SNV	Exon 6
G330X	SNV	Exon 8
R334W	SNV	Exon 8
I336K	SNV	Exon 8
R347P	SNV	Exon 8
R347H	SNV	Exon 8

Variation (allgemeiner Name)	Variantentyp	CFTR-Genregion
A455E	SNV	Exon 10
Q493X	SNV	Exon 11
1717-1G>A	SNV	Intron 11
G542X	SNV	Exon 12
S549N	SNV	Exon 12
S549R(c.1647T>G)	SNV	Exon 12
G551D	SNV	Exon 12
R553X	SNV	Exon 12
R560T	SNV	Exon 12
1812-1 G>A	SNV	Intron 12
1898+1G>A	SNV	Intron 13
W846X	SNV	Exon 15
2789+5G>A	SNV	Intron 16
3120+1G>A	SNV	Intron 18
3272-26A>G	SNV	Intron 19
Y1092X(C>A)	SNV	Exon 20
M1101K	SNV	Exon 20
R1158X	SNV	Exon 22
R1162X	SNV	Exon 22
3849+10kbC>T	SNV	Intron 22
W1282X	SNV	Exon 23
N1303K	SNV	Exon 24

* DIV ist ein Akronym für Deletions-/Insertions-Variante.

DNA-Extraktion

Drei häufig verwendete, im Handel erhältliche Extraktionsmethoden, die magnetische Bead-Extraktion, die Alkoholpräzipitation und die Isolation mittels Kieselgelsäule, wurden unter Verwendung von mit EDTA antikoaguliertem Vollblut geprüft. Es wurden insgesamt 14 eindeutige Blutproben in der Studie verwendet, die Wildtyp- und drei Mutanten-Genotypen umfassten (drei Proben mit F508del, eine Probe mit I506V und eine Probe mit D110H). Die drei DNA-Extraktionsmethoden wurden von zwei verschiedenen Bedienern unabhängig getestet, von denen jeder drei Läufe pro Extraktionsmethode durchgeführt hat. Jede Extraktion wurde vom jeweiligen Bediener an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Die DNA-Konzentration und das A260/A280-Verhältnis der extrahierten gDNA-Proben wurde mithilfe der Spektralfotometrie ermittelt. Die Gesamtzahl der Proben für jede

Extraktionsmethode der Studie ist 168 (14 Proben x 2 Bediener/Extraktionsmethode x 3 Läufe/Bediener x 2 Replikate/extrahierte gDNA-Probe).

Extraktionsmethode	Anzahl der getesteten Proben	Call-Rate	Genauigkeit	Proben-First-Pass-Rate*
Alkoholpräzipitation	168	100 %	100 %	100 %
Kieselsäurefiltersäulen-Isolation	168	100 %	100 %	100 %
Extraktion des magnetischen Bead	168	100 %	100 %	100 %

* Prozent der Proben mit einer Call-Rate von über 99 % im ersten Lauf

DNA-Zugabe

Der DNA-Zugabebereich des Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose wurde untersucht, indem eine Studie zur seriellen Verdünnung mit 14 repräsentativen DNA-Proben durchgeführt wurde, die 16 eindeutige CF-Varianten enthielt. Jede Probe wurde bei 9 DNA-Zugabestufen von 1250 ng bis 1 ng (1250 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 5 ng und 1 ng) doppelt getestet. Zur Ermittlung der Genauigkeit wurden Genotyp-Proben mit bidirektionalen Sequenzierungsdaten nach Sanger und die Deletionen mit einem PCR-Assay verglichen. 1250 ng und 25 ng wurden als Ober- und Untergrenze für die DNA-Zugabe identifiziert, da sie eine Proben-First-Pass-Rate von ≥ 95 % ohne falsche Calls (100 % Genauigkeit und Call-Rate) hatten.

Die DNA-Zugaben von 1250 ng, 250 ng und 100 ng wurden mit vier repräsentativen DNA-Proben und mindestens 20 Replikaten pro DNA-Zugabestufe für jede Probe (n = 4 x 20 = 80 Proben) weiter getestet, während die Untergrenze von 25 ng mit 14 Proben und 20 Replikaten für jede Probe (n=14x20=280 Proben) getestet wurde. Die Genauigkeit und die Proben-First-Pass-Rate betrugen bei allen DNA-Zugabestufen 100 %.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Illumina MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose im DNA-Zugabebereich von 25 ng bis 1250 ng verwendet werden kann, um genaue Ergebnisse zu liefern.

Störende Substanzen

Um die Auswirkungen störender Substanzen auf das Illumina MiSeqDx-System für zystische Fibrose zu untersuchen, wurde die Leistung des Assays mit und ohne potenzielle Störsubstanzen überprüft. Es wurden acht Vollblutproben in der Studie getestet, darunter drei CF-positive Proben mit eindeutigen Genotypen. Vier körpereigene störende Substanzen (Bilirubin, Cholesterin, Hämoglobin und Triglycerid) wurden getestet, indem die Blutproben vor der DNA-Extraktion mit diesen versetzt wurden. Die Konzentrationsgrenzen für jede Substanz sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Um darüber hinaus die Störungen aufgrund der Blutentnahme (geringe Menge) zu untersuchen, wurden die Blutproben mit EDTA versetzt, und um die Störungen aufgrund der Probenvorbereitung zu untersuchen, wurde der endgültige Wasch-Puffer aus einer Kieselgelsäuren-Isolationsmethode zur bereinigten genomischen DNA zugefügt.

Der MiSeqDx 139-Varianten-Assay für zystische Fibrose erzielte mit und ohne störende Substanzen eine Call-Rate von 100 % bei allen Proben und eine Reproduzierbarkeit von 100 % in Genotyp-Calls zwischen Proben.

Um die Auswirkungen der Multiplexierung von Index-Primer-Störungen zu untersuchen, wurde eine Kreuzkontaminationsstudie mit zwei Proben, von der jede eindeutige homozygote Genotypen an vier unterschiedlichen genomischen Positionen aufwies, und zwei entsprechenden Index-Primern durchgeführt. Es wurde keine Änderung beim Varianten-Calling bei Kontaminationsgraden von unter 40 % beobachtet. Der Probengenotyp wurde heterozygot, wenn der Kontaminationsgrad mindestens 40 % betrug.

Es wurden keine Störungen durch eine der endogenen oder exogenen Störsubstanzen beobachtet.

Testsubstanz	Gesamtzahl der Replikate	Im Blut getestete Konzentration (Obergrenze)	Im Blut getestete Konzentration (Untergrenze)	Call-Rate
Bilirubin	16	684 µmol/L	137 µmol/L	100%
Cholesterin	16	13 mmol/L	2,6 mmol/L	100 %
Hämoglobin	16	2 g/L	0,4 g/L	100 %
Triglycerid	16	37 mmol/L	7,4 mmol/L	100 %
EDTA	16	7,0 mg/ml	2,8 mg/ml	100 %

Probenindizierung

Proben-Index-Primer dienen im Assay dazu, jeder Proben-DNA einen eindeutigen Barcode zuzuweisen, wodurch es möglich ist, mehrere Proben in einem einzigen Sequenzierungslauf zusammenzufassen. Es wurden insgesamt 96 Probenindizierungen mit acht eindeutigen DNA-Proben getestet, um die Fähigkeit des Assays zu überprüfen, dauerhaft Genotypaufrufe für eine angegebene Probe über verschiedene Index-Primer-Kombinationen hinweg vornehmen zu können. Jede Probe wurde mit 12 unterschiedlichen Kombinationen an Index-Primern getestet. Die Probenergebnisse wurden für alle Positionen/Varianten mit Ausnahme der zwei großen Deletionen, die anhand eines Duplex-PCR-Assay bestätigt wurden, mit bidirektionalen Sequenzierungsdaten nach Sanger verglichen. Die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit betrug für alle Proben/Index-Primer-Kombinationen 100 %.

Quellen

1 Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, et al. (2004) Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. Genetics in Medicine 6(5): 387–391.

2 Committee on Genetics. (April 2011) The American College of Obstetricians and Gynecologists Committee Opinion. Update on Carrier Screening for Cystic Fibrosis 486: 1–4.

3 Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. (2002) Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations – Correlation With Incidence Data and Application to Screening. Human Mutation 19:575 606.

4 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternan DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. Genetics in Medicine 10(12):851–868.

5 Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternen DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-related disorders. Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews. Seattle (WA): University of Washington; 2008. Available at www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250. [Online] Aktualisiert am 19. Februar 2008.

6 Katkin JP. (2012) Cystic fibrosis: Clinical manifestations and diagnosis. Verfügbar unter www.uptodate.com. [Online] 07. Dezember 2012.

7 Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, et al. 2008 Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. J Pediatr 153(2):S4–S14.

8 Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: Annual Data Report 2010.

9 Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1). Verfügbar unter www.genet.sickkids.on.ca/app. [Online] August 2013.

10 Rohlfs EM, Zhou Z, Heim R, Nagan N, Rosenblum L, et al. (2011) Cystic fibrosis carrier testing in an ethnically diverse US population. Clinical Chemistry; 57(6): 841–848.

11 Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). Verfügbar unter www.cftr2.org. [Online] August 2013.

12 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2) Project. Verfügbar unter www.nacfconference.org/art/plenaryarchives/2011.Cutting.pdf. [Online] Im Namen des CFTR2-Projekts von

Garry Cutting bei der 25th Annual North American Cystic Fibrosis Conference (NACFC) präsentiert und von der Cystic Fibrosis Foundation gesponsert. 04. November 2011. Anaheim, CA.

13 Sosnay PR, Siklosi KR, Van Goor F, Kaniecki K, Yu H, et al. (2013) Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Nat Genet. 25. August [zuerst elektronisch veröffentlicht].

14 Grody WW, Cutting GR, Klinger KW, Richards CS, Watson MS, Desnick RJ. (März/April 2001) Laboratory standards and guidelines for population-based cystic fibrosis carrier screening. Genetics in Medicine 3(2): 149–154.

15 Castellani C, Cuppens H, Macek H Jr, Cassiman JJ, Kerem E, et al. (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cystic Fibrosis 7:179–196.

16 Pratt VM, Caggana M, Bridges C, Buller AM, DiAntonio L, et al. (Mai 2009) Development of Genomic Reference Materials for Cystic Fibrosis Genetic Testing. Journal of Molecular Diagnostics 11(3): 186–193.

17 Amos J, Feldman GL, Grody WW, Monaghan K, Palomaki GE, et al. (2008 Edition, Revised 03/2011) American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories.

18 Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, et al. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genetics in Medicine. Genetics in Medicine 15(9): 733–747.

Patente und Marken

Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. und verbundenen Unternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit dem Gebrauch des hier beschriebenen Produkts (der hier beschriebenen Produkte) und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Dokument und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina nicht verwendet und zu keinem anderen Zweck verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichem Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN, ODER JEDER ANDEREN ART DER VERWENDUNG DER PRODUKTE AUSSERHALB DES GÜLTIGKEITSBEREICHS DER AUSDRÜCKLICHEN SCHRIFTLICHEN LIZENZEN ODER DER DURCH ILLUMINA GENEHMIGTEN ZULASSUNGEN IN VERBINDUNG MIT DEM ERWERB DER PRODUKTE DURCH DEN KUNDEN.

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

© 2012-2014 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Illumina und **MiSeqDx** sind Marken oder eingetragene Marken von Illumina, Inc. Alle anderen hierin enthaltenen Marken und Namen sind Eigentum der jeweiligen Eigentümer.

AMPure, Beckman und Beckman Coulter sind Marken oder eingetragene Marken der Beckman Coulter, Inc.

Kontaktinformationen

Illumina
San Diego, Kalifornien 92122, USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

EC REP

Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH Den Haag
Niederlande

Produktkennzeichnungen

Der mit jedem Kit versendete Symbolschlüssel enthält eine vollständige Referenz der Symbole, die auf der Produktverpackung und -beschriftung verwendet werden.